



CRMP5 dans les glioblastomes : fonction et voie de signalisation

Aubin Moutal

► To cite this version:

Aubin Moutal. CRMP5 dans les glioblastomes : fonction et voie de signalisation. Neurosciences. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10299 . tel-01056757

HAL Id: tel-01056757

<https://theses.hal.science/tel-01056757>

Submitted on 20 Aug 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

**ECOLE DOCTORALE NEUROSCIENCES ET COGNITION
(NSCo)**

DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 16 Décembre 2013
par

Aubin MOUTAL

CRMP5 DANS LES GLIOBLASTOMES : FONCTION ET VOIE DE SIGNALISATION

Directeur de thèse : Dr. Nicole THOMASSET

JURY :

Pr. Jérôme HONNORAT

Pr. Dominique FIGARELLA-BRANGER

Dr. Rajesh KHANNA

Dr. Nicole THOMASSET

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire
Vice-président du Conseil Scientifique
Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID
M. le Professeur Philippe LALLE
M. le Professeur Germain GILLET
M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux
Faculté d'Odontologie
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies
Département Biologie
Département Chimie Biochimie
Département GEP
Département Informatique
Département Mathématiques
Département Mécanique
Département Physique
Département Sciences de la Terre
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon
Polytech Lyon
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1
Institut Universitaire de Formation des Maîtres
Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI
Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Directeur : Mme le Professeur H. PARROT
Directeur : M. N. SIAUVE
Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN
Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Directeur : Mme S. FLECK
Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL
Directeur : M. C. COLLIGNON
Directeur : M. B. GUIDERDONI
Directeur : M. P. FOURNIER
Directeur : M. G. PIGNAULT
Directeur : M. C. VITON
Directeur : M. A. MOUGNIOTTE
Administrateur provisoire : M. N. LEBOSNE

Remerciements :

Je tiens à remercier en tout premier le Dr. Nicole Thomasset pour m'avoir accueilli dans son équipe avec un projet de recherche très intéressant et novateur. Merci de m'avoir guidé dans l'accomplissement d'une recherche de qualité. Merci pour votre passion et votre engagement scientifique. Vous m'avez toujours poussé à voir plus loin vers de nouveaux points de vue qui m'ont permis d'apprendre énormément de choses différentes d'un point de vue technique, scientifique et humain.

Je remercie le Pr. Jérôme Honnorat, directeur de l'équipe ONCOFLAM, de m'avoir accepté dans son laboratoire. Merci d'avoir cru au sujet de thèse et de nous avoir donné les moyens de le mener à bien en partageant son avis ou en proposant des solutions aux divers problèmes rencontrés.

Je remercie sincèrement le Pr. Dominique Figarella-Branger qui a accepté de juger ce travail.

Je remercie particulièrement le Dr. Rajesh Khanna qui a accepté d'évaluer mon travail de thèse, pour ses questions de passionné au cours de la soutenance et pour ce qui vient ensuite...

Je remercie la Ligue Nationale Contre le Cancer pour le financement qui m'a été attribué pour ces 3 ans de thèse et pour nous avoir soutenus une deuxième fois au moment le plus important.

Merci au Dr. David Meyronet pour l'énorme travail qu'il a fourni concernant la partie clinique de ce travail, pour son soutien à chaque étape et sa disponibilité spécialement vers la fin où l'écriture de l'article et de la thèse se faisaient en parallèle. Merci de m'avoir montré un cerveau « en vrai », pour les soirées/nuits de travail et le café qui allait avec...

Merci au Dr. Patrick Massoma pour les longues discussions sur la philosophie des CRMP. Merci pour ta passion de la science et pour m'avoir accueilli, même pendant les manips, lorsque je venais te voir dans le laboratoire.

Je remercie Céline Malleval pour sa vision très critique des expériences en cours et qui m'a encouragé à mieux réfléchir sur la valeur des résultats obtenus. Merci de m'avoir aidé à démarrer dans le laboratoire et pour ta bonne humeur.

Je remercie Marie-Eve Mayeur pour m'avoir introduit à la manipulation des animaux et sa participation à l'expérience in vivo. Merci pour ta gentillesse et les 6 kg de raclette !

Merci à Chantal Watrin, Naura Chounlamountri, Sylvie Cavagna, Dr. Véronique Rogemond et Dr. Claire Benetollo pour leur soutien technique qui a été déterminant à chaque étape de ce travail. Merci d'avoir partagé votre savoir et les petits trucs qui font marcher les manips ! Merci également pour votre joie d'aider les étudiants en détresse et pour m'avoir rappelé de mettre ma blouse.

Merci au Dr. Claire Meissirel pour les nombreuses discussions scientifiques ou non qui peuvent finir en dessous de la ceinture au moment où on s'y attend le moins...

Merci aux Dr. Nelly Noraz, Dr. Véronique Pellier-Monnin, Dr. Pascale Giraudon, Dr. Roger Besançon pour leurs enseignements et leur disponibilité aux moments où j'ai eu besoin de discuter.

Merci aux stagiaires qui ont participé à ce projet, Maryam, Joël, Elodie et Pauline.

Merci au Dr. Olivier Pascual pour avoir fait partie des jeunes du labo jusqu'en Octobre 2013 et pour avoir essayé de m'expliquer à quoi sert l'électrophysiologie (avec succès !). Merci pour avoir été venu nous avoir à chaque fois que tu nous entendais rire parce que tu avais besoin d'une pause !

Je remercie mon partenaire barbu qui est également arrivé au bout, Dr. Pierre de Rossi. Merci pour avoir fait ce bout de chemin ensemble, pour les vidéos sur Youtube, la salle de sport, les concerts, les apéros et les week-ends au labo ! Tu sais déjà tout le reste. L'Amérique est à nous mon kiki ! KFS lml !!!

Enfin je remercie toute l'équipe ONCOFLAM des plus jeunes aux plus vieux (je ne cite pas les noms parce que je vais en oublier mais je vous aime tous !) pour leur bonne humeur et leur disponibilité à chaque instant de la journée. Merci pour les instants crêpes, barbecues et repas de Noël mais aussi et particulièrement pour avoir gardé en permanence quelques sucreries au cas où les western blot ne marcheraient pas...

Je remercie toute l'équipe du Délice Kebab pour avoir fourni la matière première nécessaire à l'accomplissement de la thèse. Merci de savoir que quand j'arrive c'est un Kebab frites avec beaucoup d'harissa.

Je remercie mes parents sans qui rien ne serait arrivé. Merci de m'avoir soutenu lorsque j'ai choisi d'aller à l'université mais également au cours des années qui ont suivi pour la Licence et le Master puis le Doctorat.

Merci aux copains : Laurent, Stef, Couette, JB, DJé, Marmotte, Maud, Antoine (Kikoolol), Marine, Romain et les autres pour avoir toujours proposé une soirée, un apéro, un mariage au meilleur moment. Merci pour ces instants où vous avez été là avec vos sourires et les jeux de mots plus ou moins mauvais. Merci d'avoir supporté les références Kaamelott et les nombreuses parties de coinche.

Je tiens spécialement à remercier les Gokaigers, Go-Busters, Shinkengers, Go-Ongers et Kyoryugers pour avoir sauvé le monde de nombreuses fois au cours de ces 3 années de thèse et qui m'ont permis de prendre du recul sur le travail accompli et sur le travail à venir.

Pour finir, Je remercie profondément mon épouse Liberty, pour son soutien tout au long de la thèse. Merci d'avoir supporté les soirées et week-ends au labo alors qu'on aurait pu aller à Ikea. Merci d'avoir été présente même pendant que tu rédigeais ta propre thèse. Enfin, merci pour ta vision des choses qui m'a toujours aidé à faire de l'ordre dans ma tête. Tu m'as poussé à donner le meilleur. Je t'aime.

CRMP5 dans les glioblastomes : fonction et voie de signalisation

CRMP5 appartient à la famille des **C**ollapsin **R**esponse **M**ediator **P**rotein. Ces protéines sont très exprimées dans le cerveau en développement et les zones de neurogénèse chez l'adulte. Dans un contexte tumoral, l'expression des messagers de CRMP5 émergent dans un cluster de gènes associés à la plus faible survie des 20 patients suivis, et à la prolifération (Liang et al., 2005). Nous avons confirmé ces résultats dans une série rétrospective de 183 GBM où la forte expression protéique de CRMP5 est corrélée à une plus faible survie des patients (7.14 mois vs 10 mois) ; de plus les tumeurs exprimant fortement CRMP5 présentent un index mitotique 2 fois plus important ($p = 0.0009$) que les tumeurs exprimant faiblement CRMP5.

Dans des cultures primaires ou lignées cellulaires de GBM nous montrons que la prolifération des glioblastomes est dépendante de l'expression de CRMP5 et de la voie de signalisation Notch. Des analyses en western blot démontrent que CRMP5 protège les récepteurs Notch de la dégradation lysosomale. Nous avons approfondi ce mécanisme et montré une nouvelle voie de régulation de Notch par CRMP5 qui par une interaction protéique avec Numb, l'inhibiteur de Notch empêche la dégradation du récepteur. Parallèlement, l'analyse en immunohistochimie sur les biopsies de GBM montrent une forte expression Notch et sa cible Hes1 dans les tumeurs exprimant fortement CRMP5. Ces résultats montrent la corrélation entre l'expression de CRMP5 dans les GBM, l'activation de la voie Notch et la faible survie des patients. Le ciblage de l'interaction CRMP5-Numb est une stratégie potentielle pour un traitement ciblé des glioblastomes.

Mots clés: CRMP5, prolifération, Notch, Numb, Glioblastome

CRMP5 in Glioblastoma : function and signaling pathway

CRMP5 belongs to the **C**ollapsin **R**esponse **M**ediator **P**rotein family, highly expressed in the developing brain and in adult brain neurogenesis areas. In pathology, we identified CRMP5 as a marker of aggressivity in neuroendocrine lung tumors (Meyronet et al, 2008) while Liang et al (2005) using transcriptomic analysis of 20 Glioblastomas, revealed CRMP5 in a cluster of genes related to proliferation correlated with a poor overall survival. We confirmed these results at the protein level in a retrospective serie of 183 GBMs and correlated higher CRMP5 expression with a significantly lower median survival (7.14 months) than those with negative expression (10 months) ($p=0,026$). Furthermore, GBM with higher CRMP5 expression were characterized by a higher mitotic index.

CRMP5 knockdown (siRNA) in primary culture from GBM xenograft and in the GBM cell line GL15 showed a dependence of GBM cell proliferation for CRMP5 expression. Notch signaling pathway expression and activation was found post-translationally dependent of CRMP5 expression. These results are enlightened by a clinical study showing a poor expression of Notch 1 and Hes1 in CRMP5-negative tumours compared to CRMP5-positive GBM.

Mechanistically, we show a novel regulation of the Notch signaling pathway in GBM by CRMP5 counteracting Numb-dependent Notch receptors degradation by a direct protein interaction.

These results show that CRMP5 expression in GBM activates Notch signalling pathway to promote proliferation and poor survival. Targeting CRMP5-Numb interaction is a promising strategy for future glioblastoma treatment.

Keywords : CRMP5, proliferation, Notch, Numb, Glioblastoma

Liste d'abréviations

AAK1 : Adaptator-Associated kinase 1

AAK1 : AP-2 Associated kinase

ADAM : A Disintegrin And Metalloprotease

ADN : Acide Désoxyribonucléique

Akt : Protein Kinase B

AP-2 : protéine adaptatrice 2

aPKC : atypical Protein Kinase C

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor

BDNF/NT-3 growth factors receptor : récepteur TrkB

BrdU : Bromo-DeoxyUridine

CADASIL : Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy

CCN3 : Cyr61, Ctgf et Nov

CRMP : Collapsin Response Mediator Protein

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DAPT : N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester

DHP : DiHydroPyrimidinase

DIK1 : Protein delta homolog 1

DMSO : diméthylsulfoxyde

DNER : Delta and Notch-like Epidermal growth factor-related Receptor

DSL : Delta/Serrate/Lag-2

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Récepteur à l'EGF

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GBM : glioblastome ou glioblastome multiforme

GFP : Green Fluorescent Protein

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

HECT : Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus

ldh : isocitrate deshydrogenase

JeDi : Jagged and Delta protein

KO : Knock out

LNx : Ligand of Numb

MAGP : motif basique hélice boucle hélice

MAP2 : Microtubule Associated Protein 2

MINT: Msx2 Interacting Nuclear Target protein

MIPEP : Mitochondrial Intermediate PEPTidase

MPNST : Malignant Peripheral Nerve Sheat Tumor

mTor : mammalian Target of rapamycin

N-CoR : Nuclear receptor CoRepressor

NECD : domaine extracellulaire de Notch

NES : Nestin

NF1 : Neurofibromin 1

NICD : domaine intracellulaire de Notch

NICD : domaine intracellulaire de Notch

NLS : séquence de localisation nucléaire

NRP1 : Neuropiline 1

NS : neurosphère

OMS : Organisation Mondiale de la santé

p70S6K : p70S6 kinase

PCAF : P300/CBP Associated Factor

PDB : Protein Data Bank

PDGFRA : platelet-derived growth factor receptor

PDZL : PSD-95/Dlg/ZO-1 Ligand

PEST : répétitions du motif Proline-Glutamate-Sérine-Thréonine

PI3K : Phosphatidylinositide 3-kinase

PIP₂ : Phosphatidylinositol diphosphate

PIP₃ : Phosphatidylinositol triphosphate

PLA : Proximity Ligation Assay

PRR : Proline Rich Region
 PTB : PhosphoTyrosine Binding
 PTCH1 : Patched 1
 PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
 Ptf1a : Pancreas specific transcription factor 1a
 RAM : RBP_{jk} Associate Molecule
 RBP_{jk} : Recombination signal sequence Binding Protein Jk
 Récepteur au NMDA : récepteurs au N-méthyl-D-aspartate
 répétitions LNR : Lin12/Notch Repeats
 RFP : Red Fluorescent Protein
 RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
 ROCK : Rho kinase
 SCLC : carcinome à petites cellules du poumon
 shARN : short hairpin RNA
 Shh : voie Sonic Hedgehog
 siARN : short interfering RNA
 SMO : Smoothened
 SMRT : Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid receptor
 SNC : système nerveux central
 SNP : syndromes paranéoplasiques neurologiques
 SUMO : Small Ubiquitin-like Modifier
 TAD : domaine de transactivation
 TGCA : The Cancer Genome Atlas Network
 TLE : Transducin-Like E(spl)
 TMA : Tissue Micro-Array
 TOAD-64 : Turned On After Divison 64kDa
 TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling
 Ulip : Unc-33 Like Phosphoprotein
 VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
 VEGFR2 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2

Liste des figures :

- Figure 1 : Aspects morphologiques et cliniques des glioblastomes
- Figure 2 : Hypothèse des cellules souches tumorales pour la formation des glioblastomes
- Figure 3 : Mécanismes de maintien et de prolifération des cellules souches de glioblastome
- Figure 4 : Homologies de séquence des CRMPs
- Figure 5 : Fonctions et régulation de CRMP2 dans la polarité neuronale
- Figure 6 : Structure des oligomères de CRMP5
- Figure 7 : Homologie des récepteurs Notch
- Figure 8 : Structure générale des récepteurs Notch
- Figure 9 : Structure des motifs EGF11-13 du récepteur Notch 1
- Figure 10 : Structure générale des ligands de Notch (canoniques et non canoniques)
- Figure 11 : Structure générale des facteurs de transcription bHLH
- Figure 12 : Mécanisme d'activation du récepteur Notch en réponse à un ligand
- Figure 13 : Mécanisme d'endocytose du récepteur Notch activé
- Figure 14 : Activation transcriptionnelle des gènes cibles de la voie Notch
- Figure 15 : Dégradation du récepteur Notch pendant son trafic intracellulaire
- Figure 16 : Description des isoformes de Numb
- Figure 17 : Mécanisme d'endocytose de la E-Cadhérine par Numb
- Figure 18 : Domaines d'interaction de Numb avec ses partenaires protéiques
- Figure 19 : Régulation de la division asymétrique par Numb
- Figure 20 : Expression de CRMP5 et des récepteurs Notch dans les cellules souches de glioblastome
- Figure 21 : Modèle de prolifération cellules de glioblastome déficientes pour CRMP5
- Figure 22 : Caractérisation des cellules de glioblastome déficientes pour CRMP5 isolée par tri cellulaire
- Figure 23 : Expression de CRMP5 et Notch 1 sur un glioblastome humain
- Figure 24 : Activation des cibles d'Akt en fonction de CRMP5 dans des cellules de glioblastome
- Figure 25 : Expression de Numb dans les glioblastomes
- Figure 26 : CRMP5 abolit la dégradation lysosomale de Notch induite par Numb
- Figure 27 : CRMP5 et Numb interagissent dans les cellules de glioblastome
- Figure 28 : CRMP5 dissocie l'interaction Numb/Notch par son interaction avec les domaines de Numb impliqués dans l'endocytose

Figure 29 : Modèle de l'action de CRMP5 par l'activation de la voie Notch dans les glioblastomes

Figure 30 : Modèle proposé du rôle de CRMP5 dans la division asymétrique des cellules souches de glioblastome

Figures de l'article:

Figure 1: CRMP5 is expressed in cytoplasm and nucleus of GBM cells

Figure 2: CRMP5 expression in GBM is correlated with poor survival and increased proliferation

Figure 3: GBM cell proliferation is dependent of CRMP5 expression by G1/S cell cycle phase transition

Figure 4: CRMP5 promotes Notch receptor expression in vitro and in human GBM

Figure 5: CRMP5 controls Notch signaling pathway activation in vitro and in human GBM

Figure 6: CRMP5 expression hijacks Notch receptors degradation

Supplementary figure 1: subcellular fractionation of GL15, A172 GBM cell lines and GBM xenograft

Supplementary figure 2: CRMP5 depletion does not promote apoptosis

Supplementary figure 3: Notch 1 is activated in GL15 GBM cell line

Supplementary figure 4: CRMP5 does not modulate Notch ligand expression

Table des matières

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I-	Le glioblastome	23
1°	Définition et classification morphologique	23
2°	Classification moléculaire des glioblastomes	24
3°	Origine cellulaire des glioblastomes : théorie des cellules souches	27
4°	Stratégies de traitement des glioblastomes.....	28
a)	Les thérapies conventionnelles	28
b)	Inhibition de l'angiogénèse des glioblastomes	28
c)	Cellules souches tumorales : acteurs de la résistance aux thérapies actuelles	29
d)	Métabolisme des glioblastomes : effet Warburg.....	30
e)	Voies de signalisations et résistance aux traitements	31
II-	Collapsin Response Mediator Protein	37
1°	La famille des CRMPs.....	37
a)	Historique	37
b)	Homologies de structure des CRMP	38
c)	Caractéristiques biochimiques	39
d)	Fonctions des CRMP	40
2°	CRMP5, structure et fonctions	45
a)	Expression de CRMP5 dans le système nerveux en développement et à l'âge adulte.....	46
b)	Structure de la protéine CRMP5.....	47
c)	Rôle de CRMP5 dans le développement du système nerveux.....	49
3°	CRMP5 dans les pathologies tumorales	51
III-	La voie de signalisation Notch : mécanisme, régulations et perte de contrôle en conditions pathologiques.....	53
1°	Acteurs de la voie Notch	55
a)	Les récepteurs Notch.....	55
b)	Les ligands de Notch.....	61
c)	Les gènes-cible de Notch.....	62
2°	Expression et activation des récepteurs Notch.....	67
a)	Expression et maturation des récepteurs Notch.....	67
b)	Activation du récepteur Notch.....	70
c)	Mécanismes d'activation non canoniques de la voie Notch	77
3°	Les différents lieux de régulation de la voie Notch	77
a)	Modulation de la signalisation Notch par les ligands.....	78
b)	Mécanisme cytoplasmique d'inhibition de la voie Notch par l'induction de la dégradation du récepteur	78

c) Dégradation du domaine intracellulaire de Notch dans le noyau	79
4° Dérégulation de la voie Notch, tumorigénèse et résistance des tumeurs.....	81
a) Notch : inducteur de la transformation tumorale.....	81
b) Activation de la voie Notch dans les cancers, responsable de la résistance aux traitements	82
IV- La protéine Numb, inhibiteur physiologique de la voie Notch	85
1° La protéine Numb.....	85
a) De nombreuses isoformes issues d'un même gène.....	85
b) Structures de la protéine Numb.....	87
2° Numb est une protéine d'endocytose.....	88
a) Endocytose des récepteurs Notch par Numb	88
b) Endocytose de la E-Cadhérine.....	91
3° Numb est une protéine adaptatrice d'E3 Ubiquitine ligases	91
a) Protection de TP53 par Numb.....	91
b) Numb déstabilise la voie Sonic Hedgehog	93
c) Numb, inhibiteur physiologique de la voie Notch.....	94
4° La matrice d'endocytose dépendante de Numb dans la division asymétrique	95
5° Régulations de Numb	97
6° Numb dans les cancers, au-delà du rôle de suppresseur de tumeurs	99

RESULTS INTRODUCTION

RESULTS

I- Preliminary results.....	115
a) CRMP5 et cellules souches.	115
b) Génération et caractérisation de cellules de GBM déficientes pour CRMP5.....	117
c) CRMP5 et Notch présentent un même motif d'expression dans les Glioblastomes humains	121
II- Premier Article : CRMP5 controls GBM proliferation and survival through a Notch dependent- signaling.....	123
Résultats complémentaires à l'aticle	167
CRMP5 contrôle l'activation d'Akt de manière indépendante de mTor	167
III- Second article: CRMP5 protects Notch against Numb-mediated degradation thereby promoting Glioblastoma proliferation	169
a) Numb est exprimée dans les glioblastomes.....	169
b) CRMP5 abolit la dégradation lysosomale de Notch induite par Numb.....	171
c) CRMP5 interagit avec Numb	173
d) Détermination du domaine d'interaction entre CRMP5 et Numb.....	174
e) L'interaction CRMP5-Numb dissocie l'interaction Numb-Notch.....	175

f) Caractérisation des domaines d'interaction entre CRMP5 et Numb	177
CONCLUSION	
I- CRMP5: a new regulator of the Notch signaling pathway in glioblastomas	207
1° A new function for CRMP5 in glioblastoma proliferation	207
2° Notch signaling pathway activation for proliferation is CRMP5-dependent	212
3° A role for CRMP5 in maintaining the stemness of glioblastoma stem cells?	213
4° CRMP5 controls Notch receptors stability by protection from degradation	214
II- CRMP5 : a new regulator of the Notch inhibitor, Numb	215
1° CRMP5 interfere in Numb dependent ubiquitination but not in endocytosis	215
2° Interaction between CRMP5 and Numb protects Notch receptors from Numb-induced degradation	216
PERSPECTIVES	
I- CRMP5 : an actor of tumoral progression ?	223
1° CRMP5 and tumoral progression	223
2° CRMP5, a new player in glioblastoma stem cells asymmetric division	225
MATERIEL ET METHODES	
1° Création d'outils de biologie moléculaire pour l'analyse de la fonction de protéines	233
a) Clonage de promoteur	233
b) Mutagénèse dirigée	234
c) Amplification de plasmide	235
2° Matériel cellulaire	236
Lignées cellulaires utilisées	236
3° Transfection de cellules	236
Transfection d'acides nucléiques	236
4° Analyse de l'expression et de la localisation de protéines ou ARNm	237
a) Lyse cellulaire et Western Blot	237
b) Fractionnement cellulaire	237
c) Biotinylation de surface sur cellules transfectées	238
5° Méthodes de détection d'interaction protéine-protéine	238
a) Co-immunoprécipitation	238
b) GST-Pull Down	239
c) Détermination d'un domaine d'interaction protéique par puce à peptide	241
6° Etude des fonctions cellulaires	242
Test de la prolifération de cellules transfectées	242
BIBLIOGRAPHIE	

Rappels bibliographiques

Figure 1 : Aspects morphologiques et cliniques des glioblastomes ; Photo post-mortem d'un glioblastome dans un cerveau de patient ; détection d'un glioblastome par IRM sans prise de contraste ; illustration de la prolifération endothéliale dans un glioblastome, entouré en blanc ; Illustration d'une zone de nécrose dans un glioblastome, en périphérie de la zone de cette zone se trouve des structures de cellules en pseudo-palissades. Adapté de Louis et al., 2007

I- Le glioblastome

1° Définition et classification morphologique

Le glioblastome (GBM) fait partie de la famille des gliomes, tumeurs primitives du Système Nerveux Central (SNC), les plus fréquentes.

Appelée aussi Glioblastome Multiforme, cette tumeur représente à elle seule 12-15% des tumeurs totales intracrâniennes et 60-75% selon les continents des tumeurs de type astrocytaire. L'incidence du glioblastome est de 3-4 nouveaux cas pour 100000 personnes par an avec une proportion plus importante pour les âges de 45 à 75 ans. La préférence de sexe est faible, avec une incidence plus importante pour les hommes que pour les femmes, montrée aux Etats-Unis par un ratio mâle/femelle de 1,26.

La classification internationalement reconnue est celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Kleihues and Sobin 2000; Louis, Ohgaki et al. 2007). Cette classification prend en compte le type histologique du gliome (astrocytaire, oligodendrogliome ou mixte) et son grade évalué par des critères de malignité (atypies nucléaires, mitoses, prolifération endothéliocapillaire et nécrose). Le glioblastome est une tumeur infiltrante classée dans les astrocytomes de grade IV selon l'OMS (Louis, Ohgaki et al. 2007). Les caractéristiques histologiques permettant de diagnostiquer un glioblastome sont des atypies nucléaires, des mitoses importantes, de la prolifération des micro-vaisseaux (Figure 1) et d'importantes zones de nécrose au sein de la tumeur entourées de cellules proliférantes réalisant un aspect en pseudo-palissades (Figure 1). Certains glioblastomes présentent des plages d'aspect oligodendrogliol et résultent de l'évolution ultime d'un oligodendrogliome. Lors du diagnostic de la tumeur, celle-ci est souvent déjà très importante et répandue. La lésion est unilatérale et faiblement délimitée, le tissu nécrotique peut se trouver à côté du tissu sain ou peut occuper jusqu'à 80% de la tumeur. Le glioblastome est une tumeur hétérogène sur le plan morphologique. A côté de la forme classique deux variants majeurs sont décrits : le glioblastome à cellules géantes et le gliosarcome.

Le glioblastome peut survenir *de novo* (glioblastome primaire) ou résulter de l'évolution d'une tumeur de grade inférieur (glioblastome secondaire). Les glioblastomes primaires représentent plus de 90% des glioblastomes. Ils se développent rapidement en moins de trois mois sans antécédents cliniques et sans symptômes pouvant prédire l'apparition de la tumeur. Ils sont préférentiellement détectés dans les patients plus âgés (médiane 62 ans). L'origine cellulaire de ces glioblastomes primaires serait la transformation maligne d'une cellule souche neurale.

Les glioblastomes secondaires sont beaucoup moins fréquents que les glioblastomes primaires avec moins de 10% d'incidence et sont détectés chez des patients plutôt jeunes (médiane 45 ans). Les glioblastomes secondaires émergent à partir d'astrocytomes diffus (WHO grade II) ou d'astrocytomes anaplasiques (WHO grade III). La durée d'évolution d'une tumeur de faible grade vers un glioblastome est très variable, de 1 an à 10 ans. Il est important de noter que la survie des patients atteints de glioblastome secondaire est plus importante que celle des patients atteints de glioblastome primaire. Les glioblastomes primaires et secondaires représentent des entités bien distinctes d'un point de vue moléculaire et en termes de réponse aux traitements dont les détails seront abordés plus loin.

2° Classification moléculaire des glioblastomes

Les glioblastomes sont des tumeurs très hétérogènes au niveau intra-tumoral et inter-individu. Chaque tumeur peut avoir une origine cellulaire différente, émerger d'une zone du cerveau différente ou d'une autre tumeur de bas grade. Ces différences résultent en une réponse distincte de chaque individu aux thérapies classiques. La mise en place d'une classification moléculaire des glioblastomes a été effectuée pour tendre vers une meilleure stratégie de traitement de ces tumeurs et mieux comprendre l'origine et la physiopathologie des variants morphologiques. La classification actuelle repose sur l'identification des aberrations génomiques recensées par The Cancer Genome Atlas Network (TCGA) dans une cohorte de 173 patients atteint de GBM. Sur des données d'analyse transcriptomique de 173 GBM et de deux échantillons de cerveau normal, 4 sous-groupes de glioblastomes ont été identifiés (Verhaak, Hoadley et al. 2010). Les sous-types identifiés pourraient correspondre à une origine cellulaire différente caractérisée par les gènes spécifiques de certains lignages cellulaires représentatifs du développement de système nerveux central. Le **sous-type Proneural** montre une amplification de gènes caractéristiques des oligodendrocytes en développement (platelet-derived growth factor receptor PDGFRA, NKX2-2, Olig2) correspondant à des cellules faiblement différenciées. Dans ce sous-type, les glioblastomes présentent une amplification du gène PDGFRA et des mutations sur le gène suppresseur de tumeur de la protéine p53 (TP53) et le gène de l'isocitrate deshydrogénase (*idh1*). Les mutations IDH1 et 2 sont des marqueurs diagnostiques préférentiels de tumeurs gliales mais aussi des GBM primaires par rapport aux GBM secondaires (95% des cas). Ces mutations sont intéressantes car elles correspondent à un meilleur pronostic clinique pour les patients (Parsons, Jones et al. 2008). Les glioblastomes de type proneuraux expriment aussi fortement les gènes impliqués dans la prolifération et le cycle cellulaire. Le **sous-type Neural** est enrichi en gènes neuronaux typiques liés à la transmission synaptique et au guidage axonal (NEFL, GABRARA1, SYT1, SLC12A5). Ce sous-type présente peu d'anomalies chromosomiques. Les glioblastomes **du sous-**

type classique présentent le plus d'altérations chromosomiques, et auraient comme origine des cellules de lignage astrocytaire. Ils sont caractérisés par une amplification du chromosome 7 et par conséquent du gène du Récepteur à l'EGF (EGFR) avec la mutation activatrice (EGFRvIII) et une perte du chromosome 10 correspondant à la perte de l'anti-oncogène PTEN (Phosphatase and TENSin homolog). Le sous-type classique est enrichi en gènes de précurseurs neuronaux et de cellules souches comme Nestin (NES), Notch 3 et son ligand Jagged 1. Les voies de signalisation impliquées dans le maintien des cellules souches neurales comme Notch et Sonic Hedgehog sont très exprimées dans ces tumeurs. Le dernier **sous-groupe mésenchymateux** de glioblastomes correspond à une signature moléculaire de cellules mésenchymateuses (CHI3L1 ou YKL40 a chitinase-like proteins, MET) et des gènes de cellules astrocytaires réminiscent d'une transition épithélio-mésenchymateuse décrite dans d'autres modèles (Thiery 2002). Ce groupe exprime des gènes de marqueurs de cellules de Schwann, de la réponse immunitaire et de l'inflammation. Une forte proportion de glioblastomes de type mésenchymateux sont mutés ou délétés sur les anti-oncogènes NF1 (Neurofibromin 1) et PTEN qui ont tous deux pour cible Akt (ou Protein Kinase B). Ces tumeurs ont la caractéristique d'être très nécrotiques avec l'expression d'effecteurs de la voie du Tumor necrosis Factor (NFκB TRADD, RELB, TNFRSF1A) (Verhaak, Hoadley et al. 2010).

Récemment, une analyse transcriptomique sur 123 tumeurs de glioblastome a permis l'émergence d'une signature moléculaire comprenant 14 gènes, corrélée à la faible survie moyenne des patients atteints de GBM. Ces gènes sont représentatifs du sous type mésenchymateux et de cellules immunes/inflammatoires. Ces données permettraient de stratifier les patients GBM en deux groupes, de faible et haut risque dans le but d'optimiser les traitements de ces tumeurs (Arimappamagan, Somasundaram et al. 2013).

Figure 2 : Hypothèse des cellules souches tumorales pour la formation des glioblastomes ; Théorie de l'évolution clonale des cellules souches de glioblastome qui vont se diversifier en accumulant les anomalies génétiques résultant en une hétérogénéité de la tumeur (Adapté de Sottoriva et al., 2013) ; Théorie de la formation non clonale des glioblastome par amplification de plusieurs populations de cellules souches tumorales d'origine différente, se différenciant pour donner un glioblastome hétérogène (Adapté de Fomchenko et Holland, 2005)

3° Origine cellulaire des glioblastomes : théorie des cellules souches

Il a longtemps été admis que les GBM provenaient d'une cellule de lignage glial comme les astrocytes ou les oligodendrocytes. Cependant depuis une dizaine d'années, l'identification de cellules souches dans le cerveau sain et dans les tumeurs a amené une nouvelle théorie sur l'origine des glioblastomes (Singh, Clarke et al. 2004; Sanai, Alvarez-Buylla et al. 2005; Tchoghandjian, Baeza et al. 2010). La théorie des cellules souches comme origine clonale des GBM (Figure 2) postule que les tumeurs prennent naissance à partir de cellules souches qui ont acquis des altérations génétiques et épigénétiques qui leur confèrent les caractéristiques des cellules tumorales (prolifération accrue, immortalité, auto-renouvellement). Les mutations s'accompagnent de changements phénotypiques qui confèrent un avantage sélectif pour la prolifération, l'invasion et la résistance à l'apoptose (Hanahan and Weinberg 2011). Cependant, les glioblastomes restent des tumeurs très hétérogènes et la théorie selon laquelle le glioblastome serait le résultat de la transformation maligne d'une cellule souche tumorale ne permet pas d'expliquer l'hétérogénéité intrinsèque de ces tumeurs. Récemment, une étude de transcriptomique sur des échantillons de tissus prélevés à divers endroits d'un même glioblastome a montré des profils génomiques différents entre ces zones (Sottoriva, Spiteri et al. 2013). Sur ce constat, une théorie de l'évolution clonale des précurseurs tumoraux a été suggérée (Figure 2). La cellule souche initiatrice de tumeur dérive et mute de nombreuses fois au cours de la formation d'un glioblastome. Cette cellule donne plusieurs populations de cellules souches, au sein de la même tumeur, avec des caractéristiques génomiques différentes qui auront donc des réponses différentes aux divers traitements. Un autre modèle a été proposé sur la base de plusieurs populations de cellules souches qui induisent le développement d'une tumeur non-clonale avec des cellules différenciées à partir de chaque cellule souche et avec le recrutement de cellules normales (Figure 2). Il n'est pas exclu au cours de la progression tumorale, que l'apparence de cellule souche tumorale soit une conséquence de mutation de gènes de reprogrammation et non nécessairement d'initiation de la tumeur (Fomchenko and Holland 2005).

Les cellules souches tumorales ont la caractéristique d'être résistantes à la chimiothérapie (Salmaggi, Boiardi et al. 2006) et radiothérapie (Bao, Wu et al. 2006; Facchino, Abdouh et al. 2010). Plusieurs voies de signalisation ont été impliquées dans les résistances des GBM aux traitements comme l'activation de la voie Akt (Tang, Chang et al. 2013), Sonic Hedgehog (Santoni, Burattini et al. 2013) et Notch (Schreck, Taylor et al. 2010). La caractérisation de l'évolution clonale des glioblastomes et des voies de signalisation associées est un sujet de recherche important pour avancer vers le traitement de ces tumeurs (Nduom, Hadjipanayis et al. 2012; Sottoriva, Spiteri et al. 2013).

4° Stratégies de traitement des glioblastomes

a) Les thérapies conventionnelles

Les thérapies conventionnelles pour le traitement des glioblastomes reposent sur l'utilisation de la chimiothérapie et de la radiothérapie. La chimiothérapie induit des dommages irréparables dans l'ADN par des agents alkylants. Cette approche est extrêmement toxique pour les cellules tumorales qui ont une prolifération importante. La radiothérapie provoque plusieurs effets biologiques délétères pour les cellules comme la formation de radicaux libres, l'altération de l'intégrité des membranes, des dommages simples brin dans l'ADN menant à la mort des cellules tumorales. La classification moléculaire a permis d'identifier différentes sensibilités à ces traitements selon les sous-groupes de glioblastome. Ainsi les glioblastomes de sous-type proneuraux sont ceux pour lesquels une approche dite « agressive » associant radiothérapie et chimiothérapie n'aura pas d'effet supplémentaire comparée à une approche de chimiothérapie ou radiothérapie seule. Tous les autres sous-groupes profitent d'un effet de l'approche agressive et particulièrement le sous-groupe Classique pour lequel la survie des patients est fortement augmentée (Verhaak, Hoadley et al. 2010).

b) Inhibition de l'angiogénèse des glioblastomes

Dans les critères de diagnostic des glioblastomes, la prolifération des micro-vaisseaux est une caractéristique des tumeurs agressives du cerveau. Pour assurer l'apport de nutriments aux cellules tumorales, une importante neo-angiogénèse est assurée au sein de la tumeur. La formation d'un nouveau vaisseau implique la digestion de la matrice extracellulaire par des métalloprotéases suivie de la prolifération et la migration des cellules endothéliales. La prolifération accrue des cellules tumorales entraîne la formation d'une zone pauvre en oxygène et en nutriments dite hypoxique. En réponse à l'hypoxie, des facteurs pro-angiogéniques sont sécrétés pour induire la formation de nouveaux vaisseaux. D'un point de vue moléculaire, les conditions hypoxiques activent l'expression du facteur de transcription Hif1 α qui va activer la transcription de gènes de survie pour inhiber l'apoptose et favoriser la prolifération. Il active également l'expression du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), un acteur important dans l'angiogénèse des glioblastomes car il stimule la prolifération des vaisseaux et la migration des cellules. Le VEGF interagit avec son récepteur VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) pour promouvoir la formation de nouveaux vaisseaux. La très forte production de VEGF par le glioblastome en fait une des tumeurs les plus vascularisées. Les effecteurs de l'angiogénèse sont une cible de choix dans le traitement des glioblastomes pour une approche ciblée de thérapie. Approuvé pour le traitement des patients en 2009 aux États-Unis, le

Bevacizumab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF. L'utilisation de cette thérapie résulte en une régression de la tumeur au début du traitement puis les cellules deviennent résistantes et utilisent d'autres voies de signalisation pour proliférer tandis que la voie du VEGF reste inhibée. Le mécanisme de résistance a été récemment élucidé et met en jeu un changement de phénotype des cellules tumorales. Les glioblastomes après traitement anti-VEGF deviennent plus infiltrants ce qui montre que les cellules acquièrent des capacités invasives durant le traitement. Un nouveau mécanisme similaire à la transition épithélio-mésenchymateuse connue dans d'autres tumeurs a été révélé et met en jeu une interaction entre le récepteur VEGFR2 et le récepteur Met (Lu, Chang et al. 2012). Sous traitement anti-VEGF, le récepteur VEGFR2 n'est plus activé, le Récepteur Met devient actif et favorise l'expression de facteurs de reprogrammation cellulaire comme Snail, qui vont induire un changement de phénotype des cellules. Les cellules sont dirigées vers un état peu différencié et acquièrent la capacité d'envahir le tissu environnant. L'infiltration rend le glioblastome inopérable et aggrave le pronostic pour les patients. Le ciblage des mécanismes d'angiogénèse n'est donc pas une cible thérapeutique suffisante pour le traitement des glioblastomes car après une régression de la tumeur, les cellules deviennent plus agressives et résistantes aux traitements (Lu, Chang et al. 2012).

c) Cellules souches tumorales : acteurs de la résistance aux thérapies actuelles

Le glioblastome est une tumeur de très mauvais pronostic dû à une forte résistance aux traitements et à la reprise de la tumeur après traitement. Les cellules résistantes aux traitements correspondent à une population quiescente dont l'ADN n'est pas altéré par les approches de chimiothérapie et radiothérapie. Cette population est localisée dans un microenvironnement particulier formant une niche, en périphérie des vaisseaux ou dans des zones hypoxiques (Chen, Li et al. 2012). Après radiothérapie, les glioblastomes présentent un enrichissement en cellules exprimant le marqueur de cellules souches neurales et de cellules souches tumorales, CD133 (Bao, Wu et al. 2006). Ce marqueur a été utilisé pour isoler une population de cellules souches à partir de glioblastome humain. La greffe *in vivo* de 100 cellules CD133-positives a résulté en la formation d'une tumeur similaire au glioblastome d'origine alors que la greffe de 10^5 cellules CD133-négatives n'a pas mené à la formation d'une tumeur (Singh, Hawkins et al. 2004). Le marqueur CD133 a été remis en question plusieurs fois car par la suite, le potentiel tumorigène d'une population de cellules CD133-négatives a été montré. Les tumeurs formées étaient plus proliférantes et plus invasives que celles résultant de la greffe de cellules CD133-positives (Joo, Kim et al. 2008). Il est important de noter que CD133 est une

protéine dont l'expression membranaire est cyclique. Les cellules isolées sur la base de l'expression de CD133 par cytométrie en flux ont quand même une expression cytoplasmique de ce marqueur montrant leur lignage de cellules souches. De plus, il a été montré que l'expression de CD133 est indispensable au maintien de cette population et à leur potentiel tumorigène (Brescia, Ortensi et al. 2013). Pour appuyer ces résultats, au cours de la division asymétrique des cellules souches de glioblastome, CD133 est montré comme le seul marqueur en immunocytofluorescence de la cellule destinée à l'autorenouvellement alors que d'autres marqueurs publiés (Nestin, Sox 2, Olig 2) étaient distribués symétriquement (Lathia, Hitomi et al. 2011).

Cette population de cellules responsables de la résistance aux traitements et de l'échappement tumoral après traitement est une cible thérapeutique intéressante pour le traitement des glioblastomes. Les stratégies ciblant ces cellules souches tumorales sont multiples. Il reste difficile d'induire leur mort par apoptose du fait des nombreux mécanismes impliqués dans la réparation de l'ADN (Bao, Wu et al. 2006). La stratégie la plus intéressante semble être l'induction de la différenciation de cellules souche tumorales dans le but d'éliminer cette population au sein des tumeurs et de ne laisser que des cellules différenciées, sensibles aux traitements actuels. Cette approche implique le ciblage des événements biologiques caractéristiques des cellules souches tumorales et n'ayant que peu d'effet sur les autres cellules de l'organisme. Les pistes de recherche décrites jusqu'à présent impliquent l'utilisation de métabolites toxiques pour les cellules souches tumorales ou l'inhibition de voies de signalisation impliquées dans la résistance à l'apoptose comme TP53, mais également dans le maintien ou l'auto-renouvellement de cette population par la signalisation Sonic Hedgehog ou encore l'activation de la voie Notch (Persano, Rampazzo et al. 2013).

d) Métabolisme des glioblastomes : effet Warburg

Dans les mécanismes mis en place au cours de la tumorigénèse, les modifications du métabolisme ont un intérêt particulier dans les tumeurs contenant des cellules souches. L'effet Warburg est une théorie ayant pour origine l'observation que la source d'énergie principale des cellules tumorales provient d'une activité importante de la glycolyse et de la fermentation lactique alors que les cellules saines utilisent préférentiellement d'autres voies métaboliques. Les cellules tumorales peuvent avoir une glycolyse 200 fois plus importante que les cellules saines du même tissu. Dans le glioblastome cet effet est d'un intérêt particulier car les cellules souches cancéreuses utilisent la glycolyse comme première voie de synthèse d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate, molécule de stockage de l'énergie nécessaire aux réactions chimiques dans la cellule) (Vlashi, Lagadec et al. 2011). C'est une caractéristique utilisée pour détecter la présence de la tumeur dans le cerveau par tomographie par

émission de positrons avec comme substrat le fluorodésoxyglucose [^{18}F]. Dans les glioblastomes, les zones d'hypoxie ou de bas pH extracellulaire sont enrichies en cellules à haut métabolisme glycolytique (Kathagen, Schulte et al. 2013). De manière intéressante, ces zones sont également enrichies en cellules souches tumorales. Il a été montré qu'une forte concentration de glucose extracellulaire peut promouvoir le phénotype de cellules souches et la formation de neurosphères par l'induction de l'expression du facteur de reprogrammation cellulaire Nanog (Flavahan, Wu et al. 2013). Ceci constitue donc une cible thérapeutique intéressante pour cibler les cellules souches tumorales dans les glioblastomes en utilisant des analogues du glucose, toxiques pour la cellule une fois métabolisés. L'utilisation de telles molécules *in vitro* a permis d'inhiber la prolifération de cellules de GBM par un blocage de la transition de phase du cycle cellulaire G2/M par l'inhibition de l'expression de Cyclines et de la phosphorylation de la protéine kinase mTor, impliquée dans le contrôle de la croissance cellulaire. L'utilisation efficace *in vivo* de telles molécules n'a pas encore été montrée dans le cas du GBM (Poteet, Choudhury et al. 2013).

e) Voies de signalisations et résistance aux traitements

1. Induction de l'apoptose par TP53

p53 est une protéine anti-oncogénique très fréquemment mutée ou délétée dans les cancers. Dans une cellule saine, elle est constitutivement dégradée par l'E3 ubiquitine ligase HDM2. En réponse à un stress de la cellule tel que des dommages de l'ADN, p53 est transloquée au noyau où elle va promouvoir l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Dans les glioblastomes, p53 est peu mutée (36 cas sur 173 dans la classification de Verhaak) et l'activation de cette protéine est une voie thérapeutique intéressante pour le traitement de cette tumeur (Figure 3). La stratégie consiste à dissocier l'interaction p53-MDM2 pour activer l'apoptose dépendante de p53. L'utilisation d'un inhibiteur de HDM2 sur un modèle de glioblastome *in vitro* a permis d'inhiber la prolifération cellulaire et d'induire l'apoptose. Ces effets sont modérés puisque la diminution de prolifération et l'induction de l'apoptose n'a pas été efficace sur 100% des cellules traitées montrant que l'activation de p53 ne suffit pas au traitement des glioblastomes (Villalonga-Planells, Coll-Mulet et al. 2011).

Figure 3 : Mécanismes de maintien et de prolifération des cellules souches de glioblastome ; Dans les cellules souches de glioblastome, p53 est dégradée par HDM2 résultant en une résistance de ces cellules à l'apoptose ; L'activation de la voie Sonic Hedgehog résulte en l'activation de la prolifération des cellules souches de glioblastome ; L'activation de Notch est reliée à l'activation de la prolifération, l'autorenouvellement et la résistance à l'apoptose des cellules souches de glioblastome

2. Sonic Hedgehog : inducteur de la transition mésenchymateuse

La voie Sonic Hedgehog (Shh) est impliquée dans la prolifération des cellules souches neurales. Le ligand Shh se fixe sur son récepteur Patched 1 (PTCH1) qui est un inhibiteur du récepteur Smoothed (SMO). PTCH1 est internalisé et dégradé en réponse à son ligand puis SMO est activé (Figure 3), les facteurs de transcription Gli sont transloqués au noyau où ils vont jouer le rôle d'activateurs transcriptionnels de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et la migration. Dans le glioblastome, cette voie est fortement activée dans les cellules souches tumorales pour promouvoir leur prolifération. L'activation de cette voie permet également l'expression via GLI1 du facteur de transcription Snail qui va réprimer l'expression de la E-Cadherine et favoriser la migration des cellules souches de glioblastome par l'induction transitoire d'un phénotype mésenchymateux (Uchida, Arita et al. 2011). De manière intéressante, dans les progéniteurs endothéliaux, la prolifération et la migration induite par Shh se fait par l'activation de la voie PI3K/Akt (Fu, Liu et al. 2006) en synergie avec les RhoGTPases (Polizio, Chinchilla et al. 2011) et les complexes Par3, Par6 (Cain and Ridley 2009). L'inhibition de cette voie de signalisation dans un modèle de xénogreffe de cellules souches (CD133 positives) de glioblastome a résulté en une forte diminution de la progression de la tumeur mais n'a pas permis l'élimination de toutes les cellules tumorales. La xénogreffe issue de cellules non souches (CD133 négatives) de glioblastome n'est pas sensible à l'inhibition de la voie Shh. Ces résultats montrent que la signalisation Sonic Hedgehog est importante dans la prolifération mais pas au maintien des cellules souches de glioblastome (Figure 3). Cependant, l'inhibition de cette voie *in vivo* n'a pas permis d'éliminer la tumeur. Cette voie ne présente donc pas un atout thérapeutique (Sarangi, Valadez et al. 2009).

3. Dérégulation de la prolifération et activation de l'autorenouvellement des cellules souches par la voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch est une voie impliquée dans la prolifération des cellules souches avec le maintien de leur état indifférencié (Zhu, Costello et al. 2011). C'est une voie activée dans de nombreux cancers et d'un intérêt particulier dans le glioblastome qui est une tumeur avec une forte population de cellules souches responsables de la résistance aux traitements. L'expression des différents partenaires et effecteurs de la voie Notch dans le glioblastome, est reliée à une perte d'expression de l'anti-oncogène PTEN entraînant une forte activation d'Akt (El Hindy, Keyvani et al. 2013). L'activation du récepteur Notch par le ligand DLL4 n'augmente pas l'angiogenèse dans un modèle de glioblastome *in vivo* mais le réseau vasculaire existant au sein de la tumeur est renforcé. Les vaisseaux ont un diamètre plus important et les ramifications sont mieux distribuées dans la tumeur ce qui améliore l'oxygénation des cellules tumorales, favorise leur croissance avec peu de nécrose et d'apoptose intra-tumorale. De plus, les tumeurs deviennent résistantes aux thérapies anti-VEGF utilisant des anticorps bloquants (Li, Sainson et al. 2007). L'expression du gène cible de Notch *hey1* dans les glioblastomes est relié à une plus faible survie des patients par une prolifération accrue des cellules tumorales (Hulleman, Quarto et al. 2009). Un modèle murin de glioblastome induit par l'activation de l'oncogène Kras montre une activation de la voie Notch dans la tumeur, concomitante à l'expression du marqueur de cellules souche, Nestine. L'activation directe de la voie Notch dans ce modèle, permet l'activation directe du promoteur du gène *nestin*. Ceci montre un rôle direct de Notch dans la formation de la population de cellules souches tumorales au sein du glioblastome (Shih and Holland 2006). De plus, les cellules endothéliales expriment le ligand de Notch DLL4 et donc activent cette voie dans les cellules souches tumorales formant les niches proches des vaisseaux. Par ce mécanisme, les glioblastomes assurent l'amplification et le maintien de la population de cellules résistantes aux traitements (Zhu, Costello et al. 2011). L'ensemble de ces données montrent que la voie de signalisation Notch est une voie clé impliquée dans la physiopathologie des glioblastomes liée à un pronostic plus grave pour les patients. La voie de signalisation Notch est une cible thérapeutique intéressante pour le traitement des GBM car elle permet le ciblage des cellules souches tumorales. Les mécanismes d'activation de la voie Notch sont connus. L'étape clé impliquant un clivage du récepteur par le complexe γ -secretase, indispensable à la transactivation des gènes cibles de la voie de signalisation. L'inhibition de la voie de signalisation dépendante du récepteur Notch 1 en utilisant une approche génétique (siRNA) a fortement réduit la croissance *in vitro* et *in vivo* de cellules de glioblastome (Figure 3). Cette approche n'est pas satisfaisante car une prolifération résiduelle des

cellules restait présente, certainement due à la contribution des autres récepteurs Notch (Wang, Wang et al. 2012). L'utilisation d'inhibiteurs du complexe γ -secretase est une meilleure stratégie car tous les récepteurs Notch peuvent être ciblés par ce genre d'approche ce qui assure une inhibition complète de la voie de signalisation. Dans un modèle de cellules souches tumorales *in vitro* (neurosphères), l'utilisation d'un inhibiteur de γ -secretase a résulté en une perte d'expression des marqueurs de cellules indifférenciées CD133, Nestine, Olig2 et BMI1. Les cellules traitées ont perdu leur capacité d'autorenouvellement. Dans un modèle *in vivo* de xénogreffe de glioblastome, les tumeurs traitées ont été éliminées du fait d'une augmentation de l'apoptose concomitante à l'inhibition de la prolifération. Ces résultats renforcent l'importance de la voie de signalisation Notch dans les glioblastomes et son intérêt comme cible thérapeutique (Figure 3). Les inhibiteurs de γ -secretase ont l'inconvénient de provoquer de très fort effets secondaires notamment au niveau des intestins et du pancréas ce qui les rend, pour l'instant, inutilisables pour le traitement des patients (Fan, Khaki et al. 2010). Il est nécessaire d'élaborer d'autres approches d'inhibition de la voie Notch pour une nouvelle thérapie ciblée des glioblastomes.

	Identifiant Uniprot	CRMP1	CRMP2	CRMP3	CRMP4	CRMP5	CRMP
CRMP1	Q14194		76,22%	74,30%	69,06%	49,13%	46,49%
CRMP2	Q16555	76,22%		76,57%	69,93%	50,35%	47,32%
CRMP3	Q14195	74,30%	76,57%		69,93%	49,74%	48,33%
CRMP4	O14531	69,06%	69,93%	69,93%		47,99%	47,49%
CRMP5	Q9BPU6	49,13%	50,35%	49,74%	47,99%		45,30%
CRMP	Q8IPQ2	46,49%	47,32%	48,33%	47,49%	45,30%	

Figure 4 : Homologies de séquence des CRMP ; comparaison des homologies de séquence protéique des protéines de la famille des CRMP humaines entre elles et avec l'homologue de drosophile ; les identifiants de chaque protéine est indiqué, l'alignement a été réalisé deux à deux sur le logiciel Clustal W en ligne (Pôle Bioinformatique Lyonnais)

II- Collapsin Response Mediator Protein

1° La famille des CRMPs

La famille des Collapsin Response Mediator Protein (CRMP) est composée de 5 isoformes étroitement liées. Ces protéines ont été premièrement impliquées dans le développement du système nerveux par leur rôle dans la transduction du signal Semaphorin 3A (Goshima, Nakamura et al. 1995; Deo, Schmidt et al. 2004). Plus tard de nombreuses autres fonctions ont été associées aux CRMP dans le système immunitaire, le système nerveux ou encore des cancers. Les protéines CRMP sont très homologues entre elles (Figure 4) et ont des structures tridimensionnelles similaires. Elles forment des homo- ou hétéro-tétramères entre elles dont la fonction et le mécanisme d'action ne sont pas encore connus. Les protéines CRMP sont régulées par phosphorylation et ont la particularité d'être toutes clivées dans le cerveau par la Calpaïne. La fonction de ce clivage n'est pas connue pour toutes les isoformes de la famille (Jiang, Kappler et al. 2007).

a) Historique

Les protéines de la famille des CRMP ont été découvertes en très peu de temps (entre 1995 et 2000) par plusieurs équipes et dans plusieurs organismes modèles. Cette « synchronisation » des équipes de recherche dans le monde a donné lieu à de nombreux noms différents pour ces protéines. Le premier membre identifié dans un modèle d'embryon de poulet s'est appelé CRMP-62 pour Collapsin Response Mediator Protein-62 kDa (Collapsine est l'ancien nom de la Sémaphorine 3A), qui correspond maintenant à une des isoformes de CRMP2 (Goshima, Nakamura et al. 1995). Lorsque cette même protéine a été identifiée chez le rat dans les neurones post-mitotiques, elle fut nommée TOAD-64 pour Turned On After Division 64kDa (Minturn, Fryer et al. 1995). En 1996, une nouvelle protéine impliquée dans la croissance axonale a été identifiée et nommée pour son homologie avec le gène de *C. elegans* Unc-33, Ulip pour Unc-33 Like Phosphoprotein (Byk, Dobransky et al. 1996) correspondant à CRMP4. La même année, le clonage d'une série de protéines présentant une forte homologie dans le cerveau de rat a donné lieu à l'identification de la famille CRMP (CRMP 1 à 4) qui ont été reliée à la transduction du signal Semaphorine (Wang and Strittmatter 1996). Au même moment, une enzyme hépatique impliquée dans le métabolisme des acides nucléiques a été clonée et nommée selon son activité, DiHydroPyrimidinase (DHP). Cette enzyme présentait une forte analogie de séquence avec les protéines CRMP-62 ou TOAD-64 qui ont été renommées DRP 1 à 4 pour DHP Related Protein (Hamajima, Matsuda et al. 1996). La nomenclature actuelle a adopté la terminologie CRMP pour cette famille de protéines. Dans un souci de clarté, seule la dénomination CRMP sera utilisée par la suite.

Le premier membre de la famille, CRMP2 qui reste encore le plus étudié, a été découvert dans la voie de signalisation d'une molécule de guidage axonal, la Sémaforine 3A. La protéine CRMP1 a été clonée en 1995 à partir d'une banque de cDNA de cerveau fœtal. Le gène *dpysl1* est situé sur le chromosome 4 dans le locus p16.2 (Hamajima, Matsuda et al. 1996). La protéine CRMP2, codée par le gène *dpysl2* situé sur le chromosome 8 dans le locus p21.2 a été clonée en 1996 à partir d'une banque d'ADNc de cerveau fœtal de rat (Hamajima, Matsuda et al. 1996). La protéine CRMP3 a été clonée en 1996 à partir de cerveau de rat adulte (Byk, Dobransky et al. 1996), son gène *dpysl4* est situé sur le chromosome 10 dans le locus q26.3. Dans la même étude, la protéine CRMP4 a été identifiée (Byk, Dobransky et al. 1996), le gène *dpysl3* est situé sur le chromosome 5 dans le locus q32.

b) Homologies de structure des CRMP

La famille des CRMP est extrêmement conservée au cours de l'évolution avec environ 65% d'homologie de séquence protéique entre l'ancêtre CRMP chez la drosophile et CRMP2 chez l'homme. Cette homologie monte à 99% en comparant les protéines murines et humaines ce qui suggère un rôle crucial de ces protéines durant le développement. Le gène CRMP chez la drosophile code pour deux transcrits alternatifs donnant la protéine CRMP dans le système nerveux et DHP dans le reste du corps (Morris, Dubnau et al. 2012). Malgré cette forte homologie avec l'enzyme DHP, les CRMP n'ont pas d'activité enzymatique. La forte homologie de séquence des CRMP suggère des structures tridimensionnelles homologues qui ont pu être observées pour CRMP1 (Deo, Schmidt et al. 2004), CRMP2 (Stenmark, Ogg et al. 2007; Majava, Loytynoja et al. 2008), et CRMP5 (Ponnusamy and Lohkamp 2013). Les protéines CRMP sont sous forme globulaire avec un domaine C-terminal non-structuré impliqué notamment dans l'interaction entre les membres de la famille CRMP (Majava, Loytynoja et al. 2008). Les CRMP peuvent exister sous forme de monomère, dimère ou tétramère, chaque protéine contenant deux régions d'interaction avec les autres (Stenmark, Ogg et al. 2007). Les hétérotétramères formés avec CRMP2 sont nécessaires à l'interaction avec la Plexine A1 et la transduction du signal Sémaforine 3A (Schmidt and Strittmatter 2007). La fonction des oligomères de CRMP n'est pas encore définie et reste une piste d'étude excitante pour la suite.

c) Caractéristiques biochimiques

1. Phosphorylation des CRMP

Les CRMP ont immédiatement été identifiées comme des protéines comportant de nombreux sites de phosphorylation conservés (Byk, Ozon et al. 1998). Elles sont toutes phosphorylables par Cdk5 en réponse à la Sémaphorine 3A (Uchida, Ohshima et al. 2005). CRMP1 peut être phosphorylée sur le résidu Y504 par la kinase Fyn qui régule son interaction avec la Tubuline, ce résidu n'est pas conservé dans les autres CRMP (Buel, Rush et al. 2010). Dans un contexte tumoral, la forme longue de CRMP1 peut-être un substrat pour la GSK-3 β ce qui résulte en une augmentation des capacités invasives de cellules de cancer du poumon (Wang, Hong et al. 2012). Dans le cas de CRMP2, GSK-3 β est capable de phosphoryler le résidu T514 et d'inactiver son action dans la pousse axonale (Yoshimura, Kawano et al. 2005). Mais l'action de GSK-3 β requiert la phosphorylation du résidu S522 par Cdk5. CRMP2 est également phosphorylée sur le résidu T555 une Rho kinase (ROCK) et sur le résidu Y479 par une Src kinase (Varrin-Doyer, Vincent et al. 2009). L'interaction de CRMP4 avec les microtubules serait indépendante de sa phosphorylation. CRMP4 inhibe la pousse des neurites par son interaction avec la GTPase RhoA. Cette interaction est dépendante de la déphosphorylation de CRMP4 suite à l'inhibition de la kinase GSK-3 β (Alabed, Pool et al. 2010). CRMP4 a donc une action inhibitrice du remodelage du cytosquelette et est inhibée par phosphorylation lorsque la GSK-3 β est active. Dans le cas de CRMP5, une étude de protéomique a identifié 4 sites potentiels de phosphorylation T509, T514, T516 et S534 (Molina, Horn et al. 2007). Aucune étude n'a encore été faite sur les fonctions associées à la phosphorylation de CRMP5.

2. Clivage des CRMP : Calpaïnes

Toutes les protéines CRMP sont clivées par la Calpaïne (protéase à cystéine dont l'activité est dépendante du calcium) dans le cerveau, la localisation précise et la fonction associée à ce clivage n'est pas toujours connue (Jiang, Kappler et al. 2007).

CRMP2 est clivée par la Calpaïne dans les neurones, le fragment clivé est associé au cytosquelette et joue un rôle dans l'internalisation de la sous-unité NR2B du récepteur NMDA (récepteurs au N-méthyl-D-aspartate impliqué dans la transmission synaptique) (Bretin, Rogemond et al. 2006). Une autre étude a suggéré que cette isoforme courte serait localisée uniquement dans le noyau des cellules du cerveau en développement et serait impliquée dans la croissance des axones. De nombreuses isoformes de CRMP2 issues d'épissage alternatif ou de clivage existent et il est possible que ces deux formes courtes décrites soient différentes malgré un poids moléculaire identique

(Rogemond, Auger et al. 2008) car issues d'un mécanisme biologique différent (clivage ou épissage alternatif).

CRMP3 peut être clivée par la Calpaïne, le fragment N-Terminal de 54 kDa issu de ce clivage est transloqué dans le noyau cellulaire et impliqué dans la mort neuronale par excitotoxicité due au glutamate dans les neurones granulaires du cervelet (Hou, Jiang et al. 2006). Le mécanisme d'action de CRMP3 dans l'apoptose a été abordé dans un contexte tumoral où il été montré que p53 active l'expression du gène *dpysl4* en conditions apoptotiques. L'expression, le clivage et la localisation nucléaire de CRMP3 est indispensable pour l'activation de l'apoptose en réponse à des dommages de l'ADN. De plus, l'expression seule de CRMP3 a permis d'activer l'apoptose dans des cellules d'ostéosarcome (Kimura, Kudoh et al. 2011).

3. Activité enzymatique

Malgré leur forte homologie avec l'enzyme Dihydropyrimidase, les CRMP n'ont pas d'activité enzymatique dihydropyrimidase. La seule isoforme connue pour avoir une activité enzymatique est la CRMP3. En effet, la forme tronquée, nucléaire de CRMP3 a montré une forte activité Histone Désacétylase spécifique de l'histone H4. La désacétylation résulte en une condensation de la chromatine permettant de manière directe ou indirecte, l'exposition du promoteur du gène E2F1 (facteur de transcription impliqué dans le cycle cellulaire et l'apoptose). L'apoptose, par excitotoxicité au glutamate provoque donc un influx de Ca^{2+} dans les neurones. La Calpaïne clive CRMP3 et le fragment de 54 kDa résultant est transloqué au noyau où il va désacétyler l'Histone H4 pour aboutir à l'apoptose dépendente de E2F1 (Hou, Jiang et al. 2013).

d) Fonctions des CRMP

1. Implication des CRMP dans la polarité neuronale

Les CRMPs sont des protéines essentielles dans le développement du cerveau par leur rôle dans l'établissement de la polarité neuronale c'est-à-dire au moment où les prolongements d'un neurone immature se différencient en dendrites et en axone. Cette étape est indispensable au bon développement du système nerveux et est la cause des principales anomalies de développement comme il a été observé dans les modèles d'animaux génétiquement délétés pour les gènes *dpysl*. Le modèle le plus utilisé *in vitro* pour étudier la mise en place de la polarité neuronale est le neurone d'hippocampe. Les évènements morphologiques sont très bien connus et se déroulent en 5 étapes

précises. Dans la première étape, les neurones en culture forment des petits prolongements qui partent du corps cellulaire (Soma) et quelques épines (étape 1). Puis, ces prolongements se développent pour former des neurites (étape 2). A ce moment, les neurites sont toutes de longueur équivalente et il n'est pas possible de déterminer laquelle va devenir l'axone. Ensuite, une des neurites va changer de morphologie pour s'allonger très rapidement et c'est à ce moment-là que les neurones établissent la polarité neuronale (étape 3). Enfin, les neurites restantes acquièrent une morphologie dendritique (étape 4) et les neurones en culture mettent en place des synapses (étape 5) (Yoshimura, Arimura et al. 2006). La détermination de l'axone à l'étape 3 est directement reliée à une activité importante de remodelage du cytosquelette où les CRMPs jouent un rôle crucial en synergie avec d'autres partenaires protéiques comme les Rho-GTPases et les moteurs moléculaires (dynéine, kinésine). Dans la neurite qui va se différencier en axone, se fait un important remodelage du cytosquelette, notamment pour l'assemblage des microtubules. CRMP2 interagit avec les dimères de Tubuline et des moteurs moléculaires antérogrades comme la kinésine 1 pour les transporter au niveau de l'axone, à l'extrémité dite PLUS des microtubules où l'allongement se fait (Fukata, Itoh et al. 2002; Arimura, Hattori et al. 2009). Ainsi l'activation de CRMP2 dans une structure neuritique induit sa différenciation en axone (Inagaki, Chihara et al. 2001). CRMP2 est régulée par phosphorylation dépendante de la GSK-3 β (Yoshimura, Kawano et al. 2005). Cette kinase est elle-même régulée par de nombreux autres événements en réponse aux signaux extracellulaires de détermination de la polarité neuronale. Brièvement, dans la neurite qui va devenir l'axone (Figure 5), la protéine PI3K (Phosphatidylinositide 3-kinase) est activée et va catalyser la formation de PIP₃ (Phosphatidylinositol triphosphate) à partir de PIP₂ (Phosphatidylinositol diphosphate). Le PIP₃ aura deux effets importants, d'une part l'activation d'Akt par phosphorylation et d'autre part l'activation de la RhoGTPase Cdc42 qui va ensuite activer le complexe de polarité contenant Par3, Par6 et aPKC (atypical Protein Kinase C). Ces deux événements ont pour résultante l'inactivation de GSK-3 β par phosphorylation (Figure 5). Cette inactivation permet à CRMP2 de promouvoir la formation de l'axone. Dans les autres neurites qui vont devenir des dendrites, toute cette voie de signalisation est inhibée par la présence d'une enzyme, PTEN. Elle va catalyser la déphosphorylation du PIP₃ en PIP₂ résultant en l'inhibition d'Akt et du complexe de polarité Par3/Par6/aPKC (Figure 5). Ceci entraîne l'activation de la GSK-3 β qui inhibe CRMP2 par phosphorylation sur la Thréonine 514 et permet ainsi la formation de la dendrite (Jiang, Guo et al. 2005).

Figure 5 : Fonctions et régulation de CRMP2 dans la polarité neuronale ; Dans le futur axone, PI3K active Akt et le complexe de polarité Par3-Par6-aPKC pour inactiver GSK-3 β et promouvoir la formation de l'axone et l'élongation des microtubules ; dans la future dendrite, Akt et le complexe de polarité sont inhibés par PTEN, GSK-3 β est activée et phosphoryle CRMP2 pour inhiber le remodelage du cytosquelette et favoriser la formation de la dendrite.

Le rôle de CRMP2 dans la polarité neuronale est maintenant clairement identifié ainsi que ses régulations. Cependant, l'inhibition de CRMP2 dans les futures dendrites ne suffit pas à expliquer l'arrêt du remodelage du cytosquelette car la protéine CRMP2 phosphorylée n'a pas d'action dans la stabilisation du cytosquelette. Pour comprendre ce phénomène de formation des dendrites, une autre protéine de la famille des CRMP intervient, CRMP3. En effet, les souris déficientes pour CRMP3 (CRMP3 KO) montrent un défaut de développement des dendrites dans la région CA1 de l'hippocampe (Quach, Massicotte et al. 2008). L'expression de CRMP3 dans les dendrites inhibe la polymérisation des microtubules résultant en une stabilisation du cytosquelette et l'inhibition de la pousse des neurites (Aylsworth, Jiang et al. 2009). CRMP3 est responsable d'une diminution de la taille des dendrites et peut augmenter leur nombre en culture (Quach, Wilson et al. 2013). Cependant, cette protéine n'est pas capable à elle seule de provoquer un arrêt complet du remodelage du cytosquelette. CRMP5 joue un rôle très important dans l'établissement de la polarité neuronale qui sera décrit plus loin.

2. Les CRMP régulent la migration et l'invasion

Du fait de leur importance dans le remodelage du cytosquelette il n'est pas étonnant que les CRMP soient associées à la migration des cellules dans des tissus sains ou non. CRMP1 est régulée par phosphorylation et joue un rôle dans la pousse dendritique en réponse à la Sémaphorine 3A (Yamashita, Morita et al. 2007). Dans un contexte tumoral, l'expression de CRMP1 a été retrouvée dans divers cancers comme le glioblastome où elle aurait une fonction d'inhibition de la migration cellulaire puisque la perte de l'expression de CRMP1 dans des lignées cellulaires de GBM résulte en une augmentation de leur capacité migratoire et invasive, dépendante de l'EGFR (Mukherjee, DeSouza et al. 2009).

CRMP2 interagit avec des éléments du cytosquelette mais également avec des protéines impliquées dans l'endocytose et le trafic intracellulaire de vésicules (dynéine et kinésine). Son interaction avec la protéine adaptatrice Numb est impliquée dans l'endocytose des protéines d'adhésion L1-CAM (Nishimura, Fukata et al. 2003). CRMP2 interagit avec le moteur moléculaire Dynéine dans l'endocytose des protéines MICAL-L1 (Rahajeng, Giridharan et al. 2010). Dans le système immunitaire, CRMP2 est exprimée dans les lymphocytes T activés et est impliquée dans leur polarisation puis leur migration (Vincent, Collette et al. 2005).

CRMP4 est exprimée dans le cancer du pancréas mais sa fonction n'est pas clairement élucidée du fait de résultats contradictoires. D'une part, CRMP4 a été associée à une plus faible survie des patients qui n'est pas dépendante de la prolifération des cellules tumorales. L'extinction de CRMP4

dans une lignée de cancer du pancréas a supprimé la capacité invasive de ces cellules suggérant que CRMP4 pourrait être reliée à la formation de métastases (Hiroshima, Nakamura et al. 2012). D'autre part, CRMP4 a été décrit comme un gène anti-métastatique car les métastases distantes du cancer du pancréas ont perdu l'expression de cette protéine. De plus, la surexpression de CRMP4 a résulté en une inhibition de l'invasion des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* (Gao, Pang et al. 2010). Pris ensemble, ces résultats suggèrent que l'action de CRMP4 irait au-delà du remodelage du cytosquelette et pourrait être impliquée dans la régulation d'un phénotype invasif de cellules tumorales.

3. Les CRMP contrôlent la progression dans la mitose

Le cycle de division qui permet à la cellule de croître, maturer et transmettre son patrimoine génétique s'effectue en trois grandes phases appelées interface, mitose et cytokinèse. Au cours du cycle cellulaire dans les étapes de la métaphase, la protéine CRMP2 a été observée associée aux faisceaux de microtubules des cellules mitotiques (Gu and Ihara 2000). Pour un autre membre de la famille, un modèle de souris déficiente CRMP1 a apporté le rôle fonctionnel de cette protéine dans la cytokinèse (Chen, Lee et al. 2009). Le remodelage du cytosquelette est un événement important de la mitose, dans ce contexte, CRMP2 a été décrite associée au cancer du sein. L'expression de CRMP2 au niveau ARNm et protéine est diminuée dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain mais la forme phosphorylée de CRMP2 n'a été détectée que dans le noyau des cellules tumorales. Ces résultats suggèrent que la localisation nucléaire de la forme phosphorylée de CRMP2 serait impliquée dans la progression du cancer du sein (Shimada, Ishikawa et al. 2013). Pour renforcer ces observations, l'expression de CRMP2 a été détectée dans les cancers du poumon mais n'est reliée à la survie des patients que dans sa forme phosphorylée. La phosphorylation de CRMP2 semble être liée à une prolifération accrue des cellules tumorales dépendante de l'interaction de phospho-CRMP2 avec les fuseaux mitotiques. L'expression de mutants non-phosphorylables de CRMP2 a entraîné l'induction de l'apoptose dépendante de p53 dans les cellules de cancer du poumon. De la même manière, l'extinction de l'expression de CRMP2 (siRNA) dans les mêmes cellules a induit leur apoptose. Ces résultats montrent que l'expression et la phosphorylation de CRMP2 dans les cancers du poumon est un marqueur de mauvais pronostic du fait de la prolifération accrue des cellules tumorales. Il est important de noter que cette étude concerne uniquement les cancers du poumon non à petites cellules (Oliemuller, Pelaez et al. 2013).

Comme CRMP2, CRMP4 est impliquée dans la mitose par son interaction avec les filaments de Tubuline. L'interaction de CRMP4 avec les microtubules serait indépendante de sa phosphorylation. Au cours de la mitose la protéine CRMP4 recruterait RhoA sur les filaments mitotiques puis serait

phosphorylée par GSK-3 β pour induire le relargage de RhoA et permettre la progression de la métaphase vers l'anaphase (Ong Tone, Dayanandan et al. 2010). Les protéines CRMP1, CRMP3 et CRMP5 n'ont pas été décrites dans ce contexte.

4. Implication de CRMP2 dans l'endocytose de canaux calciques

Récemment CRMP2 a été impliquée dans l'adressage membranaire d'un canal calcique voltage dépendent (CaV2.2) entraînant une augmentation de l'entrée des ions Ca²⁺ dans la cellule, relié à la transduction de signaux nociceptifs dans des modèles de douleur (Brittain, Duarte et al. 2011). Cette interaction est régulée par la phosphorylation de CRMP2 sur le résidu S522, substrat de Cdk5 (Brittain, Wang et al. 2012). CRMP2 interagit avec le canal CaV2.2 par son domaine A484-L498. L'inhibition de l'interaction CRMP2-CaV2.2 par une approche de peptides bloquants a résulté en une diminution de l'influx de Ca²⁺ dans un modèle *in vitro* de culture de neurones d'hippocampe. L'utilisation *in vivo* de ce peptide dans des modèles de douleur chronique a permis d'atténuer de manière significative les réponses nociceptives (Brittain, Duarte et al. 2011). Une nouvelle voie de régulation de CRMP2 a été mise en évidence dans ce modèle, les résidus 374-376 de CRMP2 étant un site consensus de SUMOylation (Small Ubiquitin-like Modifier). Cette modification post-traductionnelle inhibe l'interaction entre CRMP2 et CaV2.2 résultant en une diminution de l'influx calcique dans les neurones donc une diminution de la transmission d'un signal nociceptif (Ju, Li et al. 2013). De manière intéressante, la séquence consensus de SUMOylation est conservée entre les différentes CRMP (Dustrude, Wilson et al. 2013; Ju, Li et al. 2013).

2° CRMP5, structure et fonctions

Le dernier membre de la famille des CRMP est la protéine CRMP5. Cette protéine a été identifiée et clonée en 1996 comme cible d'autoanticorps anti-CRMP5 (anti-CV2) chez les patients atteints de syndromes paranéoplasiques neurologiques (SNP) (Honnorat, Antoine et al. 1996). CRMP5 est aussi un marqueur précoce de carcinome de poumon à petites cellules chez certains patients atteints de SNP (Honnorat, Byk et al. 1999). Le clonage du gène *dpysl5* codant CRMP5 et situé sur le chromosome 2 dans le locus p23.3 a été réalisé par trois équipes en même temps chez le Rat (Inatome, Tsujimura et al. 2000), la Souris (Fukada, Watakabe et al. 2000) et l'Homme (Ricard, Rogemond et al. 2001). Actuellement, les fonctions associées à CRMP5 et leurs régulations sont encore peu connues. Son expression n'est presque jamais détectée dans les analyses à haut débit de protéomique (peptides

souvent confondus avec CRMP2 en spectrométrie de masse) ou transcriptomique (présente sur les puces depuis 2008). CRMP5 reste néanmoins une protéine très intéressante pouvant être d'un intérêt particulier dans les cancers de haut grade.

a) Expression de CRMP5 dans le système nerveux en développement et à l'âge adulte

La première description de CRMP5 a été faite à partir d'anticorps de patients avec un syndrome paranéoplasique neurodégénératif. Une bande de 66 kDa a été identifiée en faible quantité par western blot sur du cerveau de rat adulte suggérant que la protéine est faiblement exprimée dans le cerveau adulte (Honnorat, Antoine et al. 1996). CRMP5 est fortement exprimée dans le système nerveux en développement. Après la naissance, son expression est fortement diminuée et restreinte aux zones de neurogénèse du gyrus denté, du bulbe olfactif et dans les zones subventriculaires des ventricules latéraux (Ricard, Rogemond et al. 2001; Veyrac, Giannetti et al. 2005; Veyrac, Reibel et al. 2011). Au cours du développement, au stade embryonnaire E16, CRMP5 est exprimée dans tout le système nerveux à l'exception du *Globus Pallidus*, une zone déjà bien différenciée. Après la naissance, à P5, l'expression de CRMP5 diminue dans le cervelet, le thalamus et l'hypothalamus, alors que son expression augmente dans la moelle épinière et dans les zones de neurogénèse du bulbe olfactif ou le gyrus denté. A l'âge adulte, CRMP5 reste exprimée dans les cellules indifférenciées du gyrus denté, et de l'épithélium olfactif ; les dendrites de certaines populations de neurones comme celles des cellules de Purkinje, les neurone pyramidaux du cortex et de la couche CA1 de l'hippocampe (Ricard, Rogemond et al. 2001) L'expression de cette protéine varie selon le stade de développement, les populations cellulaires et du compartiment cellulaire. Ces caractéristiques suggèrent un rôle de CRMP5 dans les processus de neurogenèse et de spécification axone/dendrite.

b) Structure de la protéine CRMP5

Les protéines de la famille des CRMP sont très homologues entre elles avec environ 70% d'homologie de séquence entre les protéines CRMP1-4. CRMP5 est la plus éloignée avec 50% d'homologie avec les autres membres de la famille. Ces similarités de séquence suggèrent des structures tridimensionnelles homologues des CRMPs. La structure de CRMP5 a été résolue par cristallographie aux rayons X. La totalité de la structure de CRMP5 n'a pas pu être résolue, car aucune densité électronique n'a été détectée pour les résidus 1-6 et 492-564 ce qui indique que ces régions sont non-structurées. Comme prédit, la structure de CRMP5 est très similaire à celle de CRMP2 et CRMP1, cristallisées sous forme de dimères. Le domaine C-terminal non structuré est dirigé vers le deuxième monomère dans la structure et pourrait être impliqué dans la dimérisation. En concentrations physiologiques, CRMP5 comme CRMP1 sont présentes sous forme de monomère alors que CRMP2 forme également des homo-tétramères. La fonction de cette oligomérisation n'est pas connue, mais, de manière intéressante, alors que la présence d'ions Mg^{2+} ou Ca^{2+} induit la tétramérisation de CRMP2, aucun effet n'a été observé sur l'oligomérisation de CRMP5. Par contre, la stabilité thermique de la protéine a été diminuée dans ces conditions. Ceci suggère que lors d'évènements biologiques augmentant la concentration de Mg^{2+} ou Ca^{2+} comme la dépolarisation de membranes, la structure de CRMP5 est déstabilisée entraînant une plus grande flexibilité de la protéine. L'analyse de la structure de CRMP5 permet également d'identifier les résidus impliqués dans son interaction avec elle-même ou avec d'autres CRMP, les résidus K265 et E223 semblent donc cruciaux pour l'oligomérisation de CRMP5 avec d'autres protéines de la famille des CRMP, la mutation de ces résidus sera une étape importante pour déterminer la fonction biologique associée aux hétéro-tétramères formés par les CRMP (Ponnusamy and Lohkamp 2013).

Figure 6 : Structure des oligomères de CRMP5 ; Structure du tétramère de CRMP5, chaque sous-unité est indiquée dans une couleur différente, l'extrémité N-terminale de chaque monomère est précisée ; structure de l'interface en hélice α du dimère de CRMP5, adapté de Ponnusamy et Lockamp, 2013

c) Rôle de CRMP5 dans le développement du système nerveux

1. CRMP5 régule la transduction des signaux de maturation des neurones

Le développement du cerveau met en jeu des processus bien régulés de maturation des neurones notamment pour la mise en place des prolongements qui vont devenir l'axone et les dendrites. Ces prolongements sont appelées neurites avec à leur extrémité un cône de croissance où se fait la réception de signaux pour contrôler sa croissance. La croissance neuritique s'effectue en quatre grandes étapes : 1)- une augmentation de la membrane plasmique avec recrutement de vésicules et fusion ; 2)- une augmentation de filaments d'actine ; 3)- une augmentation du réseau de microtubules ; 4)- une augmentation locale de molécules de signalisation (PI3K, Rho GTPases,...) (Arimura and Kaibuchi 2007). La protéine CRMP5 intervient dans ces différents processus. Un modèle de souris invalidée pour le gène codant CRMP5, *dpys/5* a montré un défaut dans les prolongements dendritiques des cellules de Purkinje du cervelet observé dans le cervelet (Yamashita, Mosinger et al. 2011). Dans l'hippocampe en développement, CRMP5 est exprimée dans le cône de croissance des neurones immatures et participe à la stabilisation du cytosquelette des neurones. Cet événement est décrit au moment du choix de l'axone par rapport aux dendrites dans la maturation des neurones. Le futur axone est une zone de fort remodelage du cytosquelette, le rôle de CRMP5 étant de stabiliser les filaments d'actine et les microtubules, son expression doit définir une future structure dendritique (Hotta, Inatome et al. 2005). D'un point de vue mécanistique, le rôle de CRMP5 dans le collapse du cône de croissance passe par son interaction avec la Tubuline et la protéine MAP2 (Microtubule Associated Protein 2). Cette interaction serait responsable de la stabilisation du cytosquelette en empêchant l'action de CRMP2 dans la pousse neuritique. Le domaine d'interaction avec la Tubuline a été en partie identifié entre les résidus L475 et H522 de CRMP5 (Brot, Rogemond et al. 2010). Un autre domaine de CRMP5 serait plus important dans cette interaction et est en cours de publication (Ponnusamy and Lohkamp, résultats non publiés).

Le collapsus du cône de croissance est induit par des signaux extracellulaires qui vont promouvoir la stabilisation du cytosquelette dans les neurites. Le rôle de CRMP5 dans le collapsus peut être activé par des facteurs répulsifs comme le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) ou la Sémaphorine 3A. Les neurones issus de souris invalidées pour le gène codant CRMP5 sont insensibles à l'action du BDNF ce qui résulte en une augmentation de la longueur des dendrites. Le BDNF agit via son récepteur TrkB (BDNF/NT-3 growth factors receptor) qui a la particularité d'avoir une activité tyrosine kinase nécessaire à la transduction du signal. Le récepteur TrkB activé par son ligand est capable de phosphoryler CRMP5 sur un ou plusieurs résidus tyrosine ce qui montre que CRMP5 inhibe la pousse des neurites lorsqu'elle est phosphorylée en réponse au BDNF. La Sémaphorine 3A participe

également au collapse du cône de croissance par son interaction avec le co-récepteur Neuropiline 1 (NRP1) (Shelly, Cancedda et al. 2011). L'action de ce facteur inhibe la signalisation par PI3K et permet l'activation de la GSK-3 β . Ces effets sont dû à un recrutement de PTEN dans la neurite pour provoquer le collapsus du cône de croissance (Chadborn, Ahmed et al. 2006). En l'absence de Sema 3A, les co-récepteurs NRP1 et Plexine A1 sont présents au niveau de la membrane plasmique sous une forme inhibitrice qui empêche le recrutement des protéines de la transduction du signal, les hétérotétramères CRMP et la kinase Fes. En présence de Sema 3A, l'inhibition par NRP1 est levée ce qui permet au corécepteur Plexin A1 de recruter Fes. Cette kinase va phosphoryler Plexine A1 ainsi que les protéines CRMP pour induire l'arrêt du cône de croissance (Mitsui, Inatome et al. 2002).

2. CRMP5 dans les zones de neurogénèse

CRMP5 est fortement exprimée durant le développement embryonnaire du système nerveux central. Après la naissance, son expression est restreinte aux zones de neurogénèse du bulbe olfactif, de la zone subventriculaire bordant les ventricules latéraux et du gyrus denté. Ces zones correspondent à une population de cellules immatures qui peuvent se différencier en cellules neuronales. Dans le bulbe olfactif, CRMP5 est exprimée dans les neurones immatures alors que son expression est perdue lors de leur différenciation. Ceci suggère que la perte de l'expression de CRMP5 est indispensable à la différenciation neuronale (Veyrac, Giannetti et al. 2005). Ces suppositions sont appuyées par une étude de phosphoprotéomique à haut débit sur la différenciation de cellules pluripotentes humaines. L'expression de CRMP5 est fortement diminuée dans les deux modèles de cellules en différenciation, montrant que la perte d'expression de CRMP5 est nécessaire à la différenciation cellulaire (Hou, Tobe et al. 2013). Dans l'hippocampe, une expression de CRMP5 a été observée au niveau des zones de neurogénèse du gyrus denté. Dans des souris génétiquement déficientes en CRMP5, les cellules immatures de cette zone présentaient une prolifération plus importante que les celles des animaux contrôle mais présentaient également une augmentation de leur apoptose. Les auteurs interprètent ces résultats comme un rôle négatif de CRMP5 dans la prolifération et la protéine CRMP5 pourrait être responsable de l'augmentation de l'apoptose observée (Veyrac, Reibel et al. 2011).

3° CRMP5 dans les pathologies tumorales

Du fait de son rôle important au cours du développement du système nerveux dans les processus de remaniement du cytosquelette, polarité et spécification axonale et de sa réexpression dans les progéniteurs neuraux chez l'adulte, il n'est pas étonnant que CRMP5 puisse jouer un rôle dans les cancers. La première description de l'expression de CRMP5 dans un contexte tumoral provient d'une étude de transcriptomique sur 20 glioblastomes qui a identifié l'expression du gène *dpysl5* comme étant associée à une plus faible survie des patients. Le cluster de gènes identifié contenait de nombreux gènes associés à la prolifération suggérant un rôle pour CRMP5 dans cette tumeur (Liang, Diehn et al. 2005). Au niveau du laboratoire, l'expression de CRMP5 a été identifiée comme un marqueur d'un type de cancers du poumon, le carcinome à petites cellules du poumon (SCLC). Ces tumeurs sont parmi les plus agressives des tumeurs neuroendocrines (Meyronet, Massoma et al. 2008). Par ailleurs, une étude de transcriptomique à haut débit sur 173 glioblastomes a permis d'identifier une expression des messagers *dpysl5* dans les deux sous-types de glioblastome les plus indifférenciés, le sous-type Proneural et le sous-type Classique. Aucun lien n'est fait entre la survie des patients et le sous-type de glioblastome mais il reste intéressant de noter que ces deux sous-types sont les plus proliférants et particulièrement résistants aux thérapies actuelles (Verhaak, Hoadley et al. 2010). L'expression protéique de CRMP5 a été détectée dans deux modèles de glioblastome, un modèle *in vitro* de lignée cellulaire GL15 et un modèle *in vivo* de xénogreffe de glioblastome humain. De manière intéressante, la protéine CRMP5 (forme longue) extraite d'une xénogreffe de glioblastome ne semble pas capable d'interagir avec la Tubuline. CRMP5 a été détectée dans le cytoplasme des cellules mais également dans les membranes et le noyau. La forme nucléaire de CRMP5 semble être d'un poids moléculaire plus faible que la forme cytoplasmique ou membranaire et pourrait résulter d'un clivage de la protéine. Une construction courte de CRMP5 dans laquelle les 72 derniers résidus d'acides aminés ont été supprimés, a permis d'identifier un site de localisation nucléaire entre les résidus P389 et I395, exposé dans cette forme uniquement. La forme courte de CRMP5 serait capable d'augmenter la prolifération de cellules de neuroblastome de souris (N1E115) (Brot, Mallevall et al. 2013). Il est important de noter que ces expériences ont été faites avec une forme tronquée de CRMP5 (1-472) de 51kDa alors que la forme courte détectée en western blot fait 58kDa, le poids théorique de CRMP5 étant de 62kDa. La construction utilisée correspond à la perte des 72 résidus d'acides aminés C-terminaux alors qu'en réalité CRMP5 ne peut pas perdre plus de 30 résidus d'acides aminés pour correspondre au poids moléculaire observé. Le rôle précis de CRMP5 dans la prolifération des cellules de glioblastome reste à caractériser précisément d'autant plus que ces résultats ont été obtenus dans des cellules non-humaines issues d'une tumeur différente.

III- La voie de signalisation Notch : mécanisme, régulations et perte de contrôle en conditions pathologiques

La voie de signalisation Notch est activée par les interactions cellulaires qui s'exercent essentiellement entre cellules voisines, dans de nombreux tissus, où elle participe au contrôle des principaux processus développementaux comme le choix de l'identité cellulaire, la différenciation, la prolifération cellulaire et l'apoptose. Par ces fonctions, la voie Notch joue un rôle fondamental dans le développement embryonnaire et à l'âge adulte.

La mutation Notch a été identifiée pour la première fois en 1914 chez *Drosophila melanogaster* par John S. Dexter, dans le cas de perte de fonctions partielles, la drosophile hétérozygote pour Notch présente des encoches (notch en anglais) à l'extrémité des ailes. De nouveaux allèles de ce gène ont été découverts en 1917 par Thomas Hunt Morgan et, à la fin des années 30, l'équipe du Dr. Poulson a montré que la perte de fonctions totales de Notch entraînait un phénotype embryonnaire létal, caractérisé par une surproduction de neurones, appelé phénotype «neurogénique» (Poulson 1937). L'étude de ces phénotypes a permis la découverte de différentes fonctions de Notch dans le développement telles que la régulation de la différenciation cellulaire. Les premières études de la voie Notch ont été menées chez *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans*. De nombreux partenaires moléculaires impliqués dans cette voie de signalisation ont ainsi été identifiés et leur mécanismes d'action résolus. Chez les mammifères, quatre gènes homologues de Notch (*notch 1* à *4*) ont été identifiés ainsi que cinq gènes de ligands de Notch (*Delta 1, 2, 4, Jagged 1* et *2*).

Le récepteur Notch est exprimé sous forme d'un précurseur clivé dans le réseau trans-golgien par une Furin convertase au site S1 (Logeat, Bessia et al. 1998). Le récepteur clivé s'associe ensuite en hétérodimère lié par des interactions non-covalentes puis est transporté à la membrane plasmique. Lors de l'interaction d'un ligand Delta/Jagged avec un récepteur Notch, le récepteur est clivé au site S2 par une métalloprotéase de la famille des ADAM (A Disintegrine And Metalloprotease) (Brou, Logeat et al. 2000; Mumm, Schroeter et al. 2000). Le domaine extracellulaire du récepteur Notch est internalisé par la cellule émettrice de signal. Le récepteur Notch restant sur la cellule réceptrice de signal est internalisé puis clivé par la γ -sécrétase aux sites S3 puis S4 (Gupta-Rossi, Six et al. 2004). Le domaine intracellulaire de Notch est ensuite transloqué dans le noyau où il va interagir avec le facteur de transcription RBP_{J κ} (Recombination signal sequence Binding Protein J κ , également nommée CSL, CBF1, Su(H) chez *Drosophila melanogaster*/ Lag-1 chez *Caenorhabditis elegans*) pour activer les gènes cibles de la voie Notch.

	Identifiant Genbank	<i>notch1</i>	<i>notch2</i>	<i>notch3</i>	<i>notch4</i>	<i>dnotch</i>
notch1	NM_017617.3		45,72%	52,71%	38,84%	46,71%
notch2	NM_024408.3	45,72%		39,49%	29,00%	41,19%
notch3	U97669.1	52,71%	39,49%		43,82%	41,55%
notch4	NM_004557.3	38,84%	29,00%	43,82%		32,10%
dnotch	NM_057511.3	46,71%	41,19%	41,55%	32,10%	

	Identifiant Uniprot	Notch1	Notch2	Notch3	Notch4	dNotch
Notch1	P46531		67,19%	60,84%	46,05%	58,02%
Notch2	Q04721	67,19%		62,24%	45,95%	57,68%
Notch3	Q9UM47	60,84%	62,24%		47,65%	51,38%
Notch4	Q99466	46,05%	45,95%	47,65%		40,68%
dNotch	P07207	58,02%	57,68%	51,38%	40,68%	

Figure 7 : Homologie des récepteurs Notch ; Homologie des ARNm des récepteurs Notch humain et drosophile alignés deux à deux sur le logiciel Clustal W ; Homologie des protéines Notch humaines et Drosophile alignés deux à deux sur le logiciel Clustal W.

La voie Notch est essentielle pour le maintien du caractère souche de cellules dans la neurogenèse et au cours du développement et chez l'adulte. De plus, cette voie régule également la différenciation de nombreux types cellulaires au niveau de leur différenciation, leur survie et pour certains leur reprogrammation en autre type cellulaire. Pour remplir efficacement ses différents rôles dans des tissus distincts, la voie Notch est étroitement régulée dans le temps et dans l'espace. Les altérations de la voie Notch telles que des mutations dans des gènes clés ou la dérégulation de la transduction du signal et de la transcription des gènes cibles est impliquée dans de nombreuses maladies génétiques mais aussi dans les cancers.

1° Acteurs de la voie Notch

a) Les récepteurs Notch

La voie de signalisation Notch est une voie d'interaction cellule-cellule activée par la fixation d'un ligand de la famille DSL (Delta/Serrate/Lag-2) sur un récepteur Notch. C'est une voie de signalisation conservée au cours de l'évolution, la drosophile possède un seul récepteur Notch tandis que les mammifères possèdent quatre récepteurs Notch différents. L'augmentation du nombre de récepteurs au cours de l'évolution reflète le nombre important de fonctions physiologiques associées à cette voie de signalisation. Pour décrire le mécanisme d'action de la voie Notch, le clonage des récepteurs a été la première étape importante qui a ensuite permis d'étudier leur structure puis leur fonction.

1. Gènes codant les récepteurs Notch

La voie de signalisation Notch est conservée au cours de l'évolution et intensivement étudiée depuis le clonage des séquences codantes des récepteurs des organismes modèles. Chez *Drosophila melanogaster*, un seul récepteur Notch est présent sur le chromosome X. Le gène identifié Dmel\N code un ARNm de 10,5kb traduit en une protéine de 288,9 kDa pour 2703 résidus d'acides aminés (Wharton, Johansen et al. 1985). Les mammifères possèdent 4 homologues Notch. Le gène *notch1* d'abord appelé *tan1* est situé sur le chromosome 9 locus q34.3, a été identifié en 1991 lors de l'analyse d'une translocation chromosomique dans un cas de leucémie (Ellisen, Bird et al. 1991). Le gène *notch2* situé sur le chromosome 1 locus p12-p11 a été cloné en 1997 à partir d'une librairie de cDNA obtenus à partir de cerveau fœtal (Blaumueller, Qi et al. 1997).

Figure 8 : Structure générale des récepteurs Notch, Comparaison des domaines structuraux des récepteurs Notch Humains et Drosophile, LNR (Lin12/Notch Repeats, HD (HeteroDimérisation domain), RAM (RBPjk Associated Molecule), ANK (Ankrin repeats), PEST (Proline-Glutamate-Sérine-Thréonine) ; Adapté de Gordon *et al.*, 2008

Lors de la recherche de mutations dans le CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy), le gène *notch3* a été identifié sur le chromosome 19 locus p13.12 (Joutel, Corpechot et al. 1996). Le gène *notch4* a été décrit lors du séquençage d'un locus oncogène murin sur le chromosome 6 locus p21.32 (Uyttendaele, Marazzi et al. 1996), c'est le membre le moins étudié de la famille. Les récepteurs Notch identifiés chez l'Homme présentent la même homologie de séquence d'ARNm (Figure 7) entre eux qu'avec leur homologue de *Drosophila melanogaster* montrant que ces 4 récepteurs sont issus d'une évolution divergente d'un point de vue génétique. C'est le récepteur Notch 1 qui est le plus proche de son ancêtre de Drosophile avec 46% d'homologie de séquence sur l'ARNm (Figure 7), ce qui suggère qu'il serait le récepteur avec les fonctions biologiques les plus proches de celles identifiées chez la drosophile.

2. Structure des récepteurs Notch

D'un point de vue protéique, les homologies de séquences entre les différents récepteurs Notch sont beaucoup plus importantes que les homologies observées sur les ARNm avec en moyenne plus de 50% d'homologie. Le récepteur Notch 4 se distingue des autres membres de la famille tandis que les Notch 1 et Notch 2 sont plus proche de l'ancêtre Drosophile (Figure 7). Ceci suggère que les récepteurs Notch 1 et Notch 2 auraient des fonctions biologiques similaires ou complémentaires. Dans l'alignement des séquences protéiques des récepteurs Notch de la Drosophile avec ses homologues humain deux régions de haute conservation sont identifiables. Dans le domaine extracellulaire les motifs EGF 8 à 12 qui doivent être importants pour l'interaction avec les ligands de Notch. Dans le domaine intracellulaire les répétitions Ankrin (Domaine structural) et le domaine de transactivation TAD sont impliqués dans l'activation de la transcription des gènes cibles de Notch. De manière intéressante, aucun des récepteurs Notch n'a moins de 40% d'homologie avec un autre membre de la famille (Figure 7). Dans la détermination de la structure d'une protéine, une des règles de la modélisation par homologie précise que si deux séquences protéiques sont homologues à plus de 30%, leur structure tridimensionnelle sera la même. Il est aisé de déduire que les structures tridimensionnelles des récepteurs de la famille Notch sont similaires. Des structures similaires entraînent également des homologies dans le comportement de la protéine dans la cellule, de même les partenaires protéiques d'un récepteur sont susceptibles d'interagir avec les autres membres de la famille. Par extrapolation, les mécanismes d'activation et de régulation des différents récepteurs Notch sont fortement similaires, les différences entre les récepteurs sont régies par une affinité différente d'un ligand pour un récepteur ou à une modulation des modifications post-traductionnelles.

Figure 9 : Structure des motifs EGF11-13 du récepteur Notch 1, structure tri-dimensionnelle des motifs du récepteurs notch impliqués dans l'interaction avec les ligands ; les motifs EGF11-13 fixent le Calcium (indiqué en jaune) ; Adapté de Kovall et Blacklow, 2010

Notch est une grande protéine transmembranaire de type I (un seul passage transmembranaire par une hélice α hydrophobe), fonctionnant comme un récepteur d'une structure hétérodimérique liée par des liaisons non covalentes. Il est composé d'une sous-unité extracellulaire et d'une autre transmembranaire.

Le fragment intracellulaire du monomère transmembranaire est composé d'un nombre important de domaines impliqués dans la transduction et la modulation du signal. Au plus près de la membrane se trouve un domaine RAM (RBPjk Associate Molecule) (Tamura, Taniguchi et al. 1995) suivi par de nombreux motifs nommés répétitions Ankrin, permettant la régulation de l'interaction avec le facteur de transcription RBPjk. Un domaine de transactivation (TAD) est présent, deux séquences de localisation nucléaire (NLS) de part et d'autre des répétitions Ankrin et une région dite PEST (répétitions du motif Proline-Glutamate-Sérine-Thréonine) qui correspond au site d'ubiquitination de Notch est impliqué dans la régulation de la stabilité de la protéine (Fryer, White et al. 2004). Le fragment extracellulaire du monomère transmembranaire de Notch présente une région d'hétérodimérisation hydrophobe impliquée dans la liaison avec le monomère extracellulaire de Notch (Figure 8).

Ce monomère extracellulaire est composé, en plus du domaine d'hétérodimérisation, de répétitions LNR (Lin12/Notch Repeats), intervenant dans la prévention de l'activation spontanée du récepteur (Sanchez-Irizarry, Carpenter et al. 2004), puis de plusieurs répétitions d'un motif EGF (Epidermal Growth Factor) pouvant fixer les ions calcium (Ca^{2+}) et pouvant subir des modifications post traductionnelles telles que des glycosylations. Ces motifs jouent un rôle critique dans l'interaction avec les ligands de Notch (Figure 8).

La structure du fragment extracellulaire du récepteur Notch1 a été résolue par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et cristallographie aux rayons X (Hambleton, Valeyev et al. 2004; Cordle, Johnson et al. 2008). Ces structures partielles ont permis d'élucider les mécanismes de fixation des ligands Delta/Jagged sur les motifs EGF 11-13 du récepteur Notch1 (Figure 9). Il a été proposé une structure rigide du domaine extracellulaire de Notch en bâton avec l'enchaînement des motifs EGF fixant le calcium, les points de flexibilité pouvant être les motifs EGF qui ne fixent pas le calcium. L'étude structurale de l'association Jagged1/Notch1 a montré que l'interaction se fait par des zones hydrophobes dans le motif EGF 12. Les mutations ponctuelles L468A et I477A ne permettent plus l'association Ligand-Récepteur alors que l'ion Calcium peut toujours être fixé par le motif EGF muté (Whiteman, de Madrid et al. 2013).

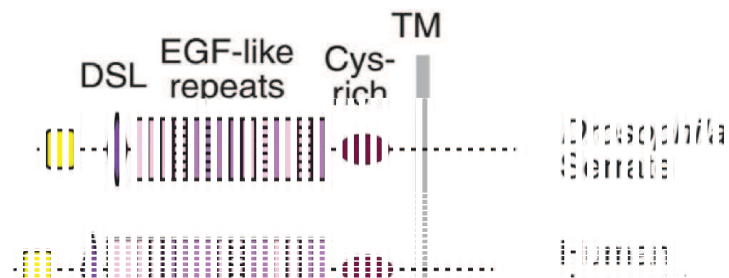


Figure 10 : Structure générale des Ligands DSL, Comparaison des domaines structuraux des ligands DSL Humains et Drosophile, DSL (Delta/Serrate/Lag2), Cys-rich (région riche en cystéine), TM (domaine transmembranaire) ; Adapté de Gordon *et al.*, 2008

b) Les ligands de Notch

La voie de signalisation Notch est activée par la fixation d'un ligand sur le récepteur Notch. Ce mécanisme est conservé au cours de l'évolution mais gagne en complexité puisqu'un seul ligand est présent chez la drosophile et on dénombre chez l'Homme 5 ligands de la famille DSL (Delta/Serrate/Lag2) dit canoniques et 14 ligands dit non canoniques dont la fonction n'est pas toujours clairement identifiée.

1. Ligands canoniques de la famille : DSL

L'interaction de Notch avec ses ligands provoque le relargage du domaine intracellulaire de Notch (NICD). Les ligands de Notch Delta et Jagged/serrate appartiennent à la famille de protéines DSL (Delta/Serrate/Lag2). Chez la drosophile, il n'y a qu'un seul ligand Delta et un Serrate. Chez les mammifères, la situation est plus complexe. Trois homologues de Delta (DII 1, DII3 et DII4) et deux homologues de Serrate (Jagged1 et Jagged2) ont été identifiés pour l'Homme et la Souris (Figure 10).

Les ligands DSL sont des protéines transmembranaires de type 1 possédant de nombreux motifs EGF dans leur domaine extracellulaire. Les ligands Jagged possèdent deux fois plus de motifs EGF que les ligands Delta-like (Figure 10). Jagged1 et Jagged 2 ont une région riche en cystéine supplémentaire qui n'est pas présente pour les Delta-like (Bray 2006).

La région la plus intéressante de ces ligands pour la signalisation Notch est le domaine extracellulaire riche en cystéines nommée DSL (Figure 10). Cette région correspond à un motif EGF dégénéré qui est nécessaire pour l'interaction avec les motifs EGF de Notch (Shimizu, Chiba et al. 1999). Les domaines intracellulaires des ligands de la famille DSL sont très peu conservés, les ligands DLL1, DLL4 et Jagged 1 possèdent un domaine supplémentaire appelé PDZL (PSD-95/Dlg/ZO-1 Ligand) C-terminal qui permet l'interaction avec le cytosquelette et pourrait jouer un rôle indépendant dans la signalisation Notch (Pintar, De Biasio et al. 2007).

2. Ligands non canoniques de la voie Notch

La caractéristique commune à tous les ligands non canoniques de Notch est que le domaine DSL, indispensable à l'interaction avec le récepteur Notch, n'est pas présent dans leur structure. Ces

ligands s'organisent en trois groupes, les ligands membranaires, les ligands à ancre GPI et les ligands sécrétés.

Les ligands membranaires sont au nombre de trois, Delta-like 1 (Dlk1), DNER (Delta and Notch-like Epidermal growth factor-related Receptor) et JeDi (Jagged and Delta protein). Dlk1 (Bachmann, Krogh et al. 1996) et DNER (Eiraku, Tohgo et al. 2005) sont tous deux capables d'activer les récepteurs Notch mais JeDi a été identifié par homologie de séquence et reste un ligand putatif de Notch en l'absence de données expérimentales (Krivtsov, Rozov et al. 2007).

Les ligands à ancre GPI sont structurellement différents des ligands membranaires. Deux ligands ont été identifiés, F3/contactin qui interagit avec les motifs EGF du domaine extracellulaire de Notch (Hu, Ang et al. 2003) pour apparemment inhiber la voie de signalisation Notch car dans le cortex l'expression de F3/contactin est liée à la perte d'expression de Hes1, gène cible de Notch (Bizzoca, Corsi et al. 2012). Le deuxième ligand identifié fait partie de la même famille de protéines, NB3/Contactin6 peut lier le récepteur Notch pour activer la voie de signalisation dans la différenciation oligodendrocytaire (Cui, Hu et al. 2004).

De nombreux ligands sécrétés de Notch ont été identifiés chez les mammifères. Ces ligands n'ont pas de domaine DSL et peuvent avoir des effets d'activateurs ou d'inhibiteurs de la voie Notch. Par exemple, le ligand CCN3 (acronyme pour un groupe de molécules, Cyr61, Ctgf, Nov, liées à la prolifération) est capable d'activer Notch de manière autocrine pour inhiber la différenciation des myoblastes (Sakamoto, Yamaguchi et al. 2002). Les protéines de la famille MAGP (Microfibril-Associated GlycoProtein) sont également capables d'activer Notch de la même manière que CCN3 lorsque qu'elles sont exprimées dans la même cellule (Miyamoto, Lau et al. 2006). Les fonctions des ligands sécrétés de Notch restent controversées par le manque de données et les effets obtenus par surexpression de ces ligands sont difficiles à observer avec une expression endogène.

c) Les gènes-cible de Notch

Les fonctions associées à la voie de signalisation Notch sont dues aux protéines exprimées en réponse à l'activation de la voie. La translocation du domaine intracellulaire de Notch dans le noyau permet la transcription des gènes cibles de Notch. Ces gènes sont associés à plusieurs fonctions cellulaires très importantes comme la prolifération, l'auto-renouvellement et l'apoptose. Selon le contexte cellulaire spatio-temporel, les gènes exprimés lors d'une réponse à la voie Notch vont

orienter le devenir cellulaire. La dérégulation de ces réponses abouti à de nombreuses maladies et notamment des cancers.

Les cibles de Notch les mieux caractérisées sont les gènes de la famille de facteurs de type basique double hélice bHLH, les gènes des familles *hes* et *hey*. L'induction de ces gènes peut être détectée 20 à 30 min après l'activation de la voie Notch (Krejci and Bray 2007). Leur expression est transitoire et dynamique, de plus ces gènes sont capables d'exercer un rétrocontrôle négatif sur tous les effecteurs de la voie Notch résultant en une activation pulsatile de leurs promoteurs que l'on appelle oscillations ultradiennes. Cet effet est très important dans la détermination de la fonction associée à l'activation de la voie Notch dans une cellule donnée.

1. Famille des facteurs de transcription bHLH

a. Structure des facteurs de transcription bHLH

Les protéines bHLH font partie d'une famille de régulateurs transcriptionnels jouant un rôle crucial dans le développement. Les protéines bHLH interagissent avec l'ADN sous forme de dimères sur des séquences consensus bien identifiées. La spécificité et la demi-vie de l'interaction entre un dimère bHLH et l'ADN est déterminé par le domaine basique qui est situé à l'interface entre les deux protéines. Ces domaines sont caractérisés par la présence de résidus hydrophobes permettant la formation d'homo- ou d'hétéro-dimères. Les protéines bHLH peuvent être classées en différents groupes, les protéines de Classe A sont des activateurs transcriptionnels comme les facteurs de différenciation MyoD et hASC1 qui interagissent avec les sites de classe A (CANCTG). Les gènes cibles de Notch de la famille *hes/hey* font partie de la classe C, ce sont des répresseurs transcriptionnels.

Chez les mammifères, 7 gènes *hes* (*hes1-7*) et 3 gènes *hey* (*hey1, 2, L*) ont été identifiés. Les protéines Hes sont composées d'un domaine basique particulier caractérisé par un résidu de proline conservé depuis la drosophile jusqu'au mammifères, d'un motif basique hélice-boucle-hélice (bHLH) suivi de deux hélices α formant le domaine Orange (Figure 11). Ce domaine joue le rôle d'interface pour des interactions protéine-protéine. Le peptide carboxyterminal WRPW des protéines Hes constitue un domaine conservé dans cette famille de protéine et impliqué dans la régulation de la demi-vie des dimères par la présence d'un motif de polyubiquitination (Kang, Seol et al. 2005). Les protéines Hes peuvent se fixer sur les motifs ADN N-box (CACNAG) et E-box (CANNTG) et recruter des corépresseurs de la famille TLE (Transducin-Like E(spl)) par leur peptide WRPW (Fisher, Ohsako et al. 1996). Les protéines Hes1, Hes5 et Hes7 peuvent être induites par le signal Notch.

Figure 11 : Structure générale des facteurs de transcription bHLH, le domaine Hélice-Boucle-Hélice est impliqué dans l'interaction avec l'ADN, Adapté de Iso *et al.*, 2003

Les membres de la famille Hey peuvent tous être induits par Notch. Ils sont composés des domaines bHLH et Orange similaires à ceux des protéines Hes (Figure 11) mais ces protéines n'ont pas la capacité de se lier aux motifs N-box. Le térapeptide carboxyterminal YRPW ou YXXW (HeyL) est différent de celui des protéines Hes, et ne peut pas recruter les protéines TLE.

b. Gènes cibles des complexes Hes/Hey

Deux mécanismes de répression de la transcription des gènes cibles sont connus. Le mécanisme de répression active se fait par la fixation d'un dimère bHLH sur le promoteur d'un gène-cible. Les protéines Hes et Hey peuvent former des homo- ou des hétéro-dimères avec des protéines de la même famille. Les hétéro-dimères Hes/Hey ont la particularité de se fixer avec plus d'affinité sur les sites de classe C pour réprimer la transcription de manière plus efficace comparée à un homo-dimère (Iso, Sartorelli et al. 2001). Le mécanisme de répression de l'activation des gènes cibles des protéines Hes/Hey n'est pas connu. Un modèle proposé implique le recrutement d'un corépresseur de la famille TLE puis la formation d'un complexe de répression de la transcription aboutissant à de multiples méthylations des histones puis le recrutement de protéines de la famille Polycomb résultant en l'inactivation du gène-cible (Patel, Bhumbra et al. 2012; Schaaf, Misulovin et al. 2013).

La répression passive se fait par la formation d'un hétéro-dimère non-fonctionnel entre une protéine de la famille Hes/Hey et une autre protéine bHLH impliquée dans l'activation transcriptionnelle. Ce mécanisme implique une inhibition par compétition de la formation de complexes activateurs souvent impliqués dans l'expression de gènes de différenciation (Chen, Thiagalingam et al. 1997). Dans le cancer du poumon à petites cellules (SCLC) une interaction entre Hes1 et le facteur de transcription achete-scute homologue 1 (hASC1) chez l'Homme ou Mash chez la Souris a été identifiée pour la formation d'hétéro-dimères ne se fixant pas à l'ADN. De manière intéressante, en plus de cette interaction, Hes1 présente la capacité de se fixer sur le promoteur de hASC1 pour réprimer activement sa transcription, inhibant ainsi la différenciation des progéniteurs neuroendocrines (Chen, Thiagalingam et al. 1997). Dans le pancréas, Hes1 inhibe activement et passivement les protéines bHLH activateurs de la transcription, Ptf1a (Pancreas specific transcription factor 1a) et Neurogenin 3 dans le choix du lignage cellulaire au cours de la différenciation. Dans un contexte tumoral, Hes1 participe au processus de tumorigénèse par la répression du gène suppresseur de tumeur PTEN (Palomero, Dominguez et al. 2008).

Les protéines Hes/Hey sont également capables de réguler négativement leur propre transcription sous forme d'homo-dimères ou d'hétéro-tetramères. Les gènes *hes/hey* possèdent dans

leur promoteur des séquences consensus de classe C sur lesquelles les dimères Hes/Hey peuvent interagir. Ainsi, après son induction, la protéine Hes1 réprime sa propre expression par l'interaction avec son promoteur. La demi-vie de la protéine est très courte (environ 20 min) ce qui aura pour conséquence une répression de courte durée. Ce mécanisme d'auto-inhibition provoque une expression oscillatoire des protéines de la famille Hes/Hey avec une périodicité variable de 2 heures (Masamizu, Ohtsuka et al. 2006). Au-delà de l'effet sur leur propre transcription, les protéines Hes/Hey sont également capables de réprimer l'expression des récepteurs Notch et de leur ligands. Ces effets sont importants car l'activation de la voie Notch et l'expression de ses gènes cibles, est oscillatoire par un rétrocontrôle négatif au niveau transcriptionnel.

2. Autres gènes cibles importants

La voie de signalisation Notch est très importante dans le développement embryonnaire de l'organisme avec une implication cruciale dans l'auto-renouvellement des cellules souches mais également à l'âge adulte où l'activation d'un récepteur Notch reste associée à de nombreuses autres fonctions biologiques comme la prolifération ou l'apoptose.

Le gène *myc* est une cible de Notch dans un certain type de leucémie (Palomero, Lim et al. 2006). L'activation de *myc* par Notch a été impliquée dans la prolifération des cellules cancéreuses ce qui implique que l'activation de la voie Notch est directement reliée à la prolifération. Dans le glioblastome, l'inhibition de la voie Notch provoque une forte diminution de la prolifération cellulaire avec un blocage de la transition de phases du cycle cellulaire G1/S (Fan, Khaki et al. 2010). Les protéines impliquées dans cette transition de phase sont activées directement par Notch dans certains contextes. Par exemple, l'expression de la CyclinD1 a été montrée directement activée par Notch dans le cancer du sein (Ling and Jolicoeur 2013) ou dans le glioblastome (Xu, Qiu et al. 2010) mais également dans des cellules saines montrant que cette fonction de Notch n'est pas un artefact dû à la transformation tumorale (Das, Lanner et al. 2010). Dans d'autres contextes, la voie de signalisation Notch est capable d'activer des inhibiteurs du cycle cellulaire comme dans le cancer à petites cellules du poumon où l'activation de Notch induit l'expression d'un inhibiteur de la transition G1/S, p21 (Sriuranpong, Borges et al. 2001).

La voie de signalisation Notch peut contrôler directement l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose. Chez les mammifères, le gène anti-apoptotique *bcl2* est une cible de la voie Notch (Ferreira, Suriano et al. 2012) pour protéger les cellules de l'apoptose. Cependant l'interaction du facteur de transcription RBP_{jk} avec le promoteur de ce gène n'a pas encore été prouvée. L'activation de la voie

Notch confère une résistance des cellules à l'apoptose et fait partie des mécanismes de résistance connus dans les cancers et notamment dans le glioblastome (Lin, Xiong et al. 2011).

2° Expression et activation des récepteurs Notch

a) Expression et maturation des récepteurs Notch

1. La première étape de maturation d'un récepteur Notch : le clivage S1

Le récepteur Notch est synthétisé sous la forme d'un précurseur de 300kDa. Ce précurseur doit passer par plusieurs étapes avant de devenir un récepteur mature. Le précurseur est tout d'abord clivé au site S1 dans le réseau trans-golgien par une protéase nommée Furine-like convertase. Le site de clivage se fait au niveau des résidus 1651-1654 du récepteur Notch1 et est indispensable pour l'adressage du récepteur à la membrane plasmique puisque la perte d'activité Furine dans une cellule entraîne une accumulation intracellulaire du précurseur Notch1 (Logeat, Bessia et al. 1998). Dans le réseau trans-golgien, la protéine Botch (NPG7) est capable d'inhiber le clivage S1 du récepteur Notch1 et induit ainsi la neurogenèse dans le néocortex de souris (Chi, Zhang et al. 2012). Les fragments N-terminal (extracellulaire) et C-terminal (Domaine transmembranaire/intracellulaire) sont assemblés en hétérodimère lié par des ponts disulfure (Blaumueller, Qi et al. 1997). L'effet de ce clivage est controversé car il a été montré récemment que des récepteurs résistants au clivage par la Furine sont capables d'être localisés à la membrane et de répondre à la stimulation par les ligands Delta ou Jagged. Le clivage S1 n'apporte qu'un faible changement de structure au niveau du domaine transmembranaire et pourrait avoir un rôle dans la modulation de la signalisation de Notch1 par rapport à Notch2 ou dans l'atténuation du signal Notch (Gordon, Vardar-Ulu et al. 2009).

2. Glycosylation et structure du récepteur Notch

Les récepteurs Notch sont soumis à des modifications post-traductionnelles qui sont indispensables pour l'export du récepteur Notch à la membrane et à l'interaction d'un récepteur avec son ligand. Au cours de la recherche de nouveaux gènes pouvant moduler la voie Notch, la glycosyltransférase Fringe a été identifiée chez la drosophile comme indispensable à l'activation de la voie Notch (Irvine and Wieschaus 1994). Chez les mammifères, deux glycanes particuliers ont été identifiés correspondant à une fucosylation et à une glucosylation (Moloney, Shair et al. 2000). La composition précise des glycanes associés aux récepteurs Notch n'est pas connue, des hypothèses sont formulées en analysant les régions consensus de glycosylation identifiées dans le domaine extracellulaire des récepteurs Notch et les enzymes connues pour allonger les glycanes.

Figure 12 : Mécanisme d'activation du récepteur Notch en réponse à un ligand ; Le domaine LNR est replié par-dessus le domaine HD et le site de clivage par ADAM 10 ; **1** : les répétitions NRR (Negative Regulatory Region) sont dépliées par la force de traction du ligand permettant l'exposition du site de clivage par ADAM 10, **2** : le récepteur est clivé dans son domaine intracellulaire pas ADAM 10 ; Adapté de Musse *et al.*, 2012

Ainsi la *O*-Fucosylation du récepteur Notch au site consensus C₂XXX(A/G/S)S/TC₃ se ferait par l'action d'une *O*-fucosyltransferase Pofut1 (Wang, Shao et al. 2001). L'action Fringe se fait après cette glycosylation pour allonger la chaîne glycanique par l'ajout de *N*-Acetylglucosamine sur un motif EGF fucosylé. La mutation des sites de fucosylation sur les motifs EGF 12, 26 et 27 du récepteur Notch1 (Souris) entraîne des changements dans la signalisation médiée par les ligands Delta/Jagged. Plus précisément, la mutation du motif EGF 12 a causé une diminution de la voie de signalisation alors que la mutation du motif EGF 26 résulte en une augmentation de l'activation de la voie. De manière intéressante, la mutation du motif EGF 27 a induit une perte du clivage S1 et de la localisation membranaire du récepteur (Rampal, Arboleda-Velasquez et al. 2005). La fucosylation du récepteur Notch module donc son affinité pour ses ligands sur le motif EGF 12, impliqué dans la *trans*-activation du récepteur ou sur le motif EGF 26 dans la *cis*-inhibition du récepteur. La fucosylation du motif EGF 27 pourrait jouer un rôle dans le repliement du récepteur (Rampal, Arboleda-Velasquez et al. 2005). Pofut-1 possède une activité de chaperone distincte de son activité *O*-fucosyltransférase dans le réticulum endoplasmique, en absence de cette activité de chaperone, le repliement et l'export de Notch à la surface des cellules est fortement compromis, ces effets sont répercutés sur toute la voie de signalisation Notch (Stahl, Uemura et al. 2008).

La *O*- glucosylation du récepteur Notch se fait sur le motif consensus CXSXP/AC₂ par l'enzyme *O*-glucosyltransferase Poglut 1 (Rumi chez la drosophile), principalement sur les motifs EGF 9 et 20 (Takeuchi, Kantharia et al. 2012). La fonction associée à la *O*-glucosylation du récepteur Notch n'est pas connue, il a cependant été proposé que cela pourrait augmenter l'affinité du récepteur Notch pour le ligand Delta-like 1 puisque la mutation du site de glucosylation sur le motif EGF 28 de Notch 1 a altéré l'activation du récepteur par le ligand DLL1 mais pas par le ligand Jagged 1 (Rana, Nita-Lazar et al. 2011). Une étude menée chez la souris montre que Poglut 1 a un rôle dans l'activation de la voie Notch car l'extinction de son expression provoque une perte de l'activation de la voie Notch alors que le récepteur reste capable de se lier aux ligands Delta/Jagged (Fernandez-Valdivia, Takeuchi et al. 2011).

b) Activation du récepteur Notch

1. Fixation du Ligand et deuxième clivage

L'activation du récepteur Notch est provoquée par l'interaction en *trans*- d'un ligand Delta/Jagged présenté par une cellule émettrice de signal sur le domaine extracellulaire de Notch (appelé NECD) présent sur la cellule réceptrice de signal. L'interaction de Notch avec un ligand se fait par les motifs EGF extracellulaires et est dépendante de la présence d'ions calcium dans certains de ces motifs EGF (Rand, Grimm et al. 2000).

L'interaction d'un récepteur Notch avec un ligand DSL provoque l'exposition d'un site de clivage appelé S2 qui est le cible des métalloprotéases ADAM 10 (Mumm, Schroeter et al. 2000) ou ADAM 17 (Brou, Logeat et al. 2000). Les séquences consensus de clivage par ces métalloprotéases sont conservées entre les différents récepteurs Notch (Brou, Logeat et al. 2000). Par la suite, ce clivage a été discuté et plusieurs études ont montré que l'enzyme indispensable à l'activation de Notch dépendante d'un ligand est ADAM 10 alors que ADAM 17 pourrait être impliquée dans le clivage de conformations différentes de Notch qui ne sont pas accessibles lors de la fixation d'un ligand (Bozkulak and Weinmaster 2009)

Ce site de clivage est enfoui dans la structure du récepteur jusqu'à la fixation du ligand. Le récepteur Notch est dans une conformation d'auto-inhibition avec le domaine NRR replié par-dessus le domaine HD (Figure 12). L'interaction du récepteur avec son ligand est suivie de la transcytose du ligand qui induit un changement de conformation du récepteur permettant l'exposition du site de clivage S2 (Musse, Meloty-Kapella et al. 2012). Il a été démontré par microscopie à force atomique que l'interaction entre Notch et son ligand Delta était très forte par rapport aux interactions ligand-récepteur connues, la force physique générée peut permettre la dissociation du récepteur (Ahimou, Mok et al. 2004) (Figure 12). Dans ces expériences, le changement de conformation induit mécaniquement, a permis l'exposition du site de clivage S2 du récepteur Notch accessible par les deux enzymes ADAM 10 et ADAM 17 (Stephenson and Avis 2012). Après le clivage S2, le complexe ligand/NECD est ensuite internalisé par la cellule émettrice du signal (Figure 13). Le fragment transmembranaire intracellulaire de Notch est internalisé par la cellule réceptrice du signal.

2. Internalisation du récepteur

L'activation de la voie Notch nécessite l'endocytose du récepteur activé dans la cellule réceptrice de signal, par la voie dépendante de la Clathrine et de la Dynamine (Seugnet, Simpson et al. 1997). La Clathrine est recrutée au niveau du site d'endocytose par le complexe AP-2 (Berdnik, Torok et al. 2002). L'initiation de l'endocytose des récepteurs Notch repose sur la monoubiquitination résidu de lysine, K1749 pour Notch1, proche de la membrane plasmique par une E3 ubiquitin ligase (Gupta-Rossi, Six et al. 2004). L'enzyme responsable de cette étape semble être l'E3 ubiquitin ligase NEDD4 car son expression est indispensable à l'internalisation du récepteur Notch (Figure 13), mais l'interaction directe entre les deux protéines n'a pas encore été démontrée chez les mammifères (Sorensen and Conner 2010). L'E3 ubiquitin ligase Deltex peut aussi être responsable de la monoubiquitination du récepteur car la perte d'expression de la protéine provoque une accumulation de récepteur notch activé à la membrane plasmique (Zheng, Saunders et al. 2013). L'étiquette Ubiquitine va promouvoir le recrutement d'adaptateurs de l'endocytose comme Epsin 1 (Sorensen and Conner 2010) et Eps15b (Figure 13) (Gupta-Rossi, Ortica et al. 2011) qui ont été décrits comme initiateurs de la courbure de la membrane plasmique lors des étapes précoces d'endocytose (Horvath, Vanden Broeck et al. 2007). Ces protéines sont capables de recruter les complexes AP2 (Sigismund, Woelk et al. 2005) pour initier l'endocytose du récepteur Notch par la voie dépendante de la Clathrine. L'initiation de l'endocytose des récepteurs Notch activés est également dépendante de Numb qui est une protéine ayant le rôle d'adaptateur par sa capacité à interagir avec les protéines Eps15 et le complexe AP-2 (Figure 13). Lorsque la formation de la vésicule de Clathrine est amorcé, la protéine AAK1 (AP-2 Associated kinase) est recrutée directement sur le récepteur Notch activé et va phosphoryler Numb et induire son relargage dans le cytoplasme (Gupta-Rossi, Ortica et al. 2011) (Figure 13).

Lors de son trafic intracellulaire, le récepteur Notch monoubiquitinylé doit être déubiquitinylé par la désubiquitinase eIF3f. La perte d'expression de cette protéine induit une perte de localisation nucléaire du récepteur Notch et donc une perte de l'activation de la voie de signalisation. En absence d'eIF3f le récepteur Notch n'est pas activé montrant le rôle d'eIF3f comme modulateur positif de l'activation de Notch (Moretti, Chastagner et al. 2010).

Figure 13 : Mécanisme d'endocytose du récepteur Notch activé ; Le récepteur est monoubiquitinylé par NEDD4, Eps15 est recrutée avec Numb pour promouvoir l'endocytose dépendante de la clathrine, AAK1 phosphoryle ensuite Numb pour induire son relargage de la vésicule d'endocytose

3. Troisième et quatrième clivages lors du trafic intracellulaire par le complexe γ -Sécrétase

Après son clivage par une métalloprotéase ADAM sur le site S2 et son internalisation, le récepteur Notch est clivé séquentiellement sur ses sites S3 et S4 par le complexe γ -secretase (De Strooper, Annaert et al. 1999). Le premier clivage se fait à proximité du feuillet cytosolique de la membrane plasmique et permet le relargage du NICD, le second clivage relargue un peptide nommé N β qui est un précurseur de protéine amyloïde, impliqué dans la maladie d'Alzheimer (Okochi, Steiner et al. 2002).

Le complexe γ -secretase est présent au niveau de la membrane plasmique, des endosomes, lysosomes, réticulum endoplasmique et appareil de Golgi. Deux théories se sont opposées dans la localisation subcellulaire du clivage du récepteur Notch activé selon si le clivage se faisait à la membrane ou uniquement lors du trafic intracellulaire du récepteur. Il a été montré que lors du blocage de l'internalisation du récepteur Notch par inhibition de l'expression des protéines impliquées dans l'initiation de l'endocytose, le clivage par le complexe γ -secretase du récepteur activé était possible (Sorensen and Conner 2010). En opposition à cela, l'endocytose du récepteur activé a été décrite comme étant indispensable à l'activation de la voie par l'utilisation d'une forme de Notch mutée au niveau du site de monoubiquitination impliqué dans les étapes précoces de l'endocytose. Ces résultats montrent donc que le clivage de Notch par le complexe γ -secretase ne pouvait se faire que dans les endosomes (Gupta-Rossi, Six et al. 2004). Cette dernière hypothèse est cohérente avec le fait que l'activité enzymatique du complexe γ -secretase est plus importante dans un environnement acide ce qui implique que le clivage au site S3 est plus efficace dans les lysosomes où le pH est plus bas (Pasternak, Bagshaw et al. 2003). Ces deux théories ne sont pas exclusives et ont été réconciliées par une étude de spectrométrie de masse montrant que le clivage du récepteur Notch est possible à la membrane plasmique et dans les compartiments intracellulaires mais le produit de ce clivage sera différent. Plusieurs formes de NICD seraient produites, une forme dite stable résultant du clivage S3-V1744 au niveau de la membrane plasmique et des formes dites instables issues d'un clivage S3-S1747 (+3 résidus d'acides aminés), les formes instables entraînant une activation plus faible des gènes cibles de Notch (Tagami, Okochi et al. 2008). Ces résultats sont cohérents car il a été récemment montré que le récepteur Notch ne peut être clivé uniquement au niveau de la membrane plasmique ou au niveau des lysosomes (Zheng, Saunders et al. 2013).

4. Un cinquième clivage possible dans la mitochondrie ?

La voie Notch a pour fonction dans la mitochondrie de protéger la cellule de l'apoptose par l'induction de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 (Ferreira, Suriano et al. 2012). Un autre mécanisme implique l'inhibition de la polymérisation de Bax lors des mécanismes d'apoptose par la voie mitochondriale. Le domaine intracellulaire du récepteur Notch peut être localisé au niveau de la mitochondrie en conditions pro-apoptotiques. L'action de Notch requière Akt et les protéines Mitofusins (GTPases impliquées dans la fusion mitochondriale). De manière intéressante, le poids moléculaire du fragment de Notch situé dans les mitochondries est plus faible que le poids moléculaire du fragment issu du clivage par la γ -secrétase (Perumalsamy, Nagala et al. 2010). Ce fragment de Notch a été ensuite identifié comme étant amputé de 8 résidus d'acides aminés après le clivage au site S3 par la protéine mitochondriale MIPEP (Mitochondrial Intermediate PEptidase). Cette dernière étude suggère que ce fragment aurait une fonction d'induction de mort de la cellule mais cette conclusion est issue d'un test de viabilité basé sur l'activité métabolique mitochondriale, avec le biais qu'une baisse d'activité métabolique n'est pas forcément associée à une induction de l'apoptose par la voie mitochondriale (Lee, Srinivasan et al. 2011). La fonction anti-apoptotique de ce fragment de Notch reste à confirmer et il serait intéressant de connaître son effet dans le cas des autres fonctions associées à la voie Notch comme l'auto-renouvellement et la prolifération cellulaire.

5. Translocation du domaine intracellulaire de Notch au noyau

Le fragment intracellulaire de Notch est relargué dans le cytosol et expose 4 sites de localisation nucléaire (NLS). Le site NLS 3 est responsable de l'import du domaine intracellulaire de Notch dans le noyau par la voie des importines α/β 1. Des expériences de précipitation avec la glutathion S-Transférase (GST-pull down) ont montré que Notch1 se liait directement aux importines α 3, α 4 et α 7 via son site NLS 3 (Huenniger, Kramer et al. 2010). Ce mécanisme est conservé dans l'évolution et a également été décrit chez la drosophile en association avec la prolifération cellulaire (Sachan, Mishra et al. 2013). Une fois le NICD dans le noyau, il va jouer un rôle de coactivateur transcriptionnel.

6. Activation des gènes-cible de la voie Notch

Une fois dans le noyau cellulaire, le domaine intracellulaire de Notch ne peut pas se fixer directement à l'ADN, il va interagir avec une protéine pouvant se fixer sur l'ADN, RBPJk. Un complexe activateur de la transcription se forme sur les promoteurs des gènes cibles de Notch contenant la séquence consensus de fixation de RBPJk, CACTGTG (Hamaguchi, Matsunami et al. 1989).

RBPJk est une protéine interagissant avec l'ADN par son domaine YRTGDGAD (Barolo, Walker et al. 2000). Une fois fixée sur le promoteur d'un gène, RBPJk va réprimer l'expression de ce gène par la formation d'un complexe de répression de la transcription (Figure 14). Les corepresseurs SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid receptor), N-CoR (Nuclear receptor CoRepressor) et MINT (Mx2 Interacting Nuclear Target protein). Ce complexe recrute ensuite des Histones desacétylases ainsi que des protéines de la famille Polycomb pour réprimer la transcription des gènes cibles en réduisant leur accessibilité par l'induction de l'enroulement de l'ADN par les Histones (Tanigaki and Honjo 2010).

Le domaine intracellulaire de Notch interagit avec le facteur de transcription RBPJk (Tamura, Taniguchi et al. 1995). Cette interaction par les domaines Ankrin et RAM de Notch provoque la dissociation des complexes de répression suivi par le recrutement de coactivateurs transcriptionnels. Le domaine RAM de Notch va interagir avec RBPJk pour ensuite permettre au domaine Ankrin de se fixer sur RBPJk et former la surface d'interaction nécessaire au recrutement du coactivateur transcriptionnel Mastermind (Nam, Sliz et al. 2006). Mastermind recrute ensuite des protéines de la famille des histones acétylases comme p300 et PCAF (P300/CBP Associated Factor) (Figure 14). Ce complexe ainsi formé va permettre un dépliement de l'ADN et l'exposition des gènes cibles de Notch pour l'activation de leur transcription (Tanigaki and Honjo 2010).

La recherche des gènes cible du couple Notch1/RBPJk a permis d'élucider les fonctions de Notch dans les cellules souches neurales par les fonctions associées aux 98 gènes identifiés. L'activation de Notch1 mène à l'activation de gènes impliqués dans l'autorenouvellement des cellules souches neurales par l'induction de l'expression de facteurs de transcription comme Sox2 et Pax6. Les facteurs de reprogrammation cellulaire Nanog et Oct4 ne possèdent pas de séquence consensus pour RBPJk dans leurs promoteurs et ne peuvent pas être directement induits par Notch. C'est pour cela que l'activation la voie Notch n'est pas suffisante pour induire le phénotype de cellules souches mais nécessaire pour le maintien de ce phénotype (Li, Hibbs et al. 2012).

Figure 14 : Activation transcriptionnelle des gènes cibles de la voie Notch, en l'absence de Notch RBPj forme un complexe de répression sur les promoteurs des gènes cibles, l'interaction avec Notch permet le recrutement de co-activateurs et de Mastermind pour activer la transcription des cibles de Notch, FBW7 induit ensuite la dégradation de Notch par polyubiquitination pour arrêter l'activation des gènes cibles de Notch, Adapté de Kovall et Blacklow, 2010

c) Mécanismes d'activation non canoniques de la voie Notch

L'activation non-canonique de la voie Notch est définie par une transduction du signal indépendante d'au moins un des composants de la voie canonique. C'est-à-dire tous les événements impliquant des ligands alternatifs, la signalisation indépendante de la protéolyse du récepteur Notch ou l'activation de la transcription des gènes cibles indépendante du domaine intracellulaire de Notch. Seul le dernier point sera décrit en mettant l'accent sur les événements d'activation non-canoniques pouvant intervenir dans les glioblastomes et qui méritent d'être pris en considération pour l'analyse des résultats de la thèse.

Parmi les voies de signalisation impliquées dans le maintien des cellules souches saines ou tumorales, la voie Sonic Hedgehog permet joue un rôle dans la prolifération par la régulation du cycle cellulaire. Dans la recherche des gènes cibles de cette voie de signalisation, *hes 1* a été montré activé de manière indépendante de RBPJk et dépendante du récepteur Smoothed (Ingram, McCue et al. 2008). Le gène cible de Notch, *hes 5* n'est pas concerné par ce mécanisme (Wall, Mears et al. 2009). L'interaction directe entre le facteur de transcription Gli 2 et le promoteur du gène *hes 1* a été montrée et deux sites de fixation ont été identifiés. Le facteur de transcription Gli 1 a également été relié à l'expression de Hes1 alors que Gli 3 n'aurait pas d'effet (Wall, Mears et al. 2009).

3° Les différents lieux de régulation de la voie Notch

La voie Notch subit des actions de régulation tout au long de ses mécanismes d'activation. Lors de la maturation du récepteur, la manière par laquelle la glycosylation se fait détermine son affinité pour ses différents ligands. La fixation du ligand en *cis*- ou en *trans*- peut activer ou inhiber le signal Notch. Les différentes étapes de clivage du récepteur sont également soumises à une régulation, notamment le complexe γ -secretase et au niveau de l'endocytose. Enfin l'activité du NICD dans le noyau est modulée par différents partenaires du complexe RBP-J/NICD pouvant activer ou réprimer la transcription des gènes cibles mais pouvant aussi diriger le NICD vers la dégradation.

a) Modulation de la signalisation Notch par les ligands

L'activation de la voie Notch nécessite la présentation d'un ligand par une cellule émettrice de signal sur un récepteur Notch à la surface de la cellule réceptrice de signal, ce mécanisme est appelé *trans*-activation. Les ligands de Notch peuvent avoir des rôles d'activateur de la voie de signalisation mais aussi d'inhibiteur dans le cas où le ligand et le récepteur sont exprimés à la surface de la même cellule, ce mécanisme est appelé *cis*-inhibition. L'interaction en *cis*- d'un ligand DSL et d'un récepteur Notch inhibe la formation d'interactions en *trans*-, ainsi une cellule adopte le rôle d'émettrice de signal ou de réceptrice de signal en fonction des niveaux d'expression endogène des ligands et des récepteurs à sa surface (Sprinzak, Lakhanpal et al. 2010). Les domaines de Notch impliqués dans la *cis*-inhibition ne sont pas connus car les travaux effectués révèlent des informations contradictoires. Il est bien connu que les motifs EGF 11-12 du récepteur Notch sont importants pour l'interaction avec les ligands mais ils ont été déclarés indispensable tant pour l'interaction en *trans*- que pour l'interaction en *cis*-, la même question est posée pour les motifs EGF 25-26. La *cis*-interaction inhibe l'activation de la voie Notch car elle empêche toute dissociation du récepteur à la surface de la cellule (Fiuza, Klein et al. 2010).

b) Mécanisme cytoplasmique d'inhibition de la voie Notch par l'induction de la dégradation du récepteur

Lors du trafic intracellulaire du récepteur Notch activé ou non, les vésicules peuvent être adressées dans la voie de dégradation lysosomale. La cellule n'aura plus de récepteur Notch disponible pour la signalisation ce qui aura pour effet l'inhibition de la transcription des gènes cibles de Notch donc l'inhibition de la voie de signalisation Notch et l'arrêt des fonctions cellulaires associées.

Le ciblage de la dégradation lysosomale pour les récepteurs Notch se fait par polyubiquitination du récepteur. Dans la division asymétrique des cellules souches, la protéine Numb a été décrite comme inhibiteur de la voie Notch. Le destin des deux cellules filles au cours de la division asymétrique est déterminé par la présence ou non de Numb dans une des deux cellules. La cellule ne contenant pas Numb possède une voie Notch active qui va promouvoir son autorenouvellement et va garder les caractères de cellule indifférenciée (Couturier, Mazouni et al. 2013). La cellule contenant Numb n'aura plus d'activation de la voie Notch et n'exprimera plus les facteurs de transcription Hes/Hey. La répression de la transcription des facteurs de différenciation sera levée pour permettre à la cellule fille

d'acquérir des caractères de cellule différenciée. La protéine Numb est un inhibiteur de Notch en induisant la dégradation du récepteur (McGill, Dho et al. 2009). Le mécanisme décrit implique le recrutement par Numb d'une E3 ubiquitin ligase qui va adresser le récepteur Notch dans la voie de dégradation lysosomale. La protéine AIP4/Ith possède une activité E3 ubiquitin ligase est recrutée par Numb et interagit avec le récepteur Notch pour promouvoir sa polyubiquitylation et sa dégradation lysosomale (Chastagner, Israel et al. 2008) (Figure 15). Plusieurs autres E3 ubiquitin ligases sont capables de catalyser la polyubiquitination des récepteurs Notch activés ou non, c-Cbl (Jehn, Dittert et al. 2002) et SEL-10/FBW7 (Wu, Lyapina et al. 2001).

Récemment, un complexe protéique catalysant la déubiquitination du récepteur Notch a été décrit. Les protéines USP12/UAF1 sont des régulateurs négatifs de la voie de signalisation Notch dont le rôle n'est pas encore connu. La perte d'expression de ce complexe augmente l'activité transcriptionnelle de la voie Notch. USP12 pourrait agir au niveau du récepteur non activé internalisé pour inhiber son recyclage vers la membrane plasmique (Moretti, Chastagner et al. 2012).

c) Dégradation du domaine intracellulaire de Notch dans le noyau

L'activation transcriptionnelle des gènes cibles de la voie Notch résulte de l'interaction du domaine intracellulaire de Notch avec le facteur de transcription RBP_{jk} suivi du recrutement de coactivateurs pour induire l'expression des protéines Hes/Hey et l'activation des fonctions cellulaires associées. La signalisation Notch est un signal très court qui peut être éteint au bout de 20 min. L'arrêt de la transcription se fait par l'adressage du NICD dans la dégradation protéasomale par l'E3 ubiquitin ligase FBW7/Sel-10 (Matsumoto, Onoyama et al. 2011) (Figure 14). La perte d'expression de cette protéine mène à l'accumulation de Notch dans le noyau et une expression aberrante des gènes cibles. La différenciation des cellules souches est inhibée et leur autorenouvellement accru. Le rôle de FBW7 serait de bloquer la voie de signalisation Notch au cours du développement pour promouvoir la différenciation des cellules souches neurales (Hoeck, Jandke et al. 2010).

Figure 15 : Dégradation du récepteur Notch pendant son trafic intracellulaire ; Le récepteur activé ou non est adressé dans la dégradation lysosomale par son interaction avec Numb et le recrutement de l'E3 ubiquitin ligase Itch

4° Dérégulation de la voie Notch, tumorigénèse et résistance des tumeurs

La voie de signalisation Notch est conservée au cours de l'évolution du fait de l'importance des fonctions qui lui sont associées. L'activation de la voie Notch permet l'amplification des cellules souches et le maintien de leur état indifférencié. Cette voie de signalisation est extrêmement régulée dans le temps et dans l'espace, la dérégulation de Notch dans le cas d'un gain de fonction peut amener à une activité aberrante de la voie et des fonctions qui lui sont associées pouvant conduire à la formation et la maintenance de cellules tumorales. D'autre part, l'expression et l'activation de Notch est associée à un mauvais pronostic dans de nombreuses tumeurs.

a) Notch : inducteur de la transformation tumorale

Dans le contexte du cancer du poumon, l'activation de la voie Notch *in vivo* induit également la transformation tumorale. Dans un modèle de souris transgénique avec le domaine intracellulaire (activé) de Notch inducible par la doxycycline, l'activation continue de Notch dans les cellules alvéolaires épithéliales du poumon a résulté en l'émergence d'une masse tumorale de type adénome. Les cellules tumorales avaient la caractéristique d'être peu différenciées et très proliférantes mais avec une apoptose importante au sein de la tumeur. De manière intéressante, l'expression de Myc concomitante à l'activation de Notch induit la formation d'adénocarcinome pulmonaire. Ainsi dans les tumeurs du poumon l'activation de Notch est une étape importante dans le processus de tumorigénèse par l'induction d'une prolifération accrue mais n'est pas suffisante pour induire un phénotype plus agressif de tumeurs pulmonaires. L'expression de Myc a permis de bloquer le processus d'apoptose consécutif à la suractivation de Notch. Il reste important de noter que dans ce modèle, l'activation de Notch a résulté en l'expression accrue de Hes 5 mais pas de Hes 1 suggérant que Hes n'est pas un gène cible de Notch dans le poumon (Allen, Rodriguez et al. 2011).

Les cellules de Schwann sont des cellules qui assurent la myélinisation des axones. La transformation tumorale de ces cellules résulte en un cancer appelé Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor (MPNST) de grade III selon l'OMS et de très mauvais pronostic. La voie de signalisation Notch permet l'amplification des précurseurs des cellules de Schwann en stimulant leur prolifération et en inhibant leur différenciation. L'activation de la voie Notch dans les cellules de Schwann adultes promeut leur dédifférenciation résultant en la démyélinisation des axones. De manière intéressante, dans le cas de blessures des nerfs, le processus de régénération des cellules de Schwann implique une

réactivation de la voie de signalisation Notch (Woodhoo, Alonso et al. 2009). L'activation ectopique de la voie Notch par transduction de cellules de Schwann en culture a permis d'activer l'expression des gènes *hes 1* et *hes 5* ainsi que de nombreux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et la transition de phase du cycle cellulaire. Les cellules de Schwann transduites ont changé de morphologie et ont perdu l'expression des marqueurs de différenciation des cellules de Schwann GFAP, P₀ et P75. L'expression du facteur de différenciation Sox10 a également été réprimée. La greffe de ces cellules *in vivo* a montré leur capacité à former des tumeurs alors que les cellules de Schwann saines greffées n'ont pas entraîné la formation d'une tumeur. En résumé, l'activation ectopique de la voie Notch dans une cellule saine différenciée telle que la cellule de Schwann, induit sa dédifférenciation par la perte de marqueurs de différenciation et permet l'expression de protéines impliquées dans la prolifération cellulaire. Ces processus sont impliqués dans la transformation tumorale de cellules saines et a permis de conférer aux cellules transduites, la capacité à former des tumeurs *in vivo*. Cette étude montre que la dérégulation de la voie Notch peut induire la formation de tumeurs agressives du système nerveux périphérique (Li, Rao et al. 2004).

La voie Notch est très importante dans le développement du système nerveux. Dans le but de tester si l'activation aberrante de Notch dans le cerveau pouvait entraîner la formation de tumeurs, un modèle de souris surexprimant le domaine intracellulaire de Notch 1 (NICD) dans le cerveau en développement a été généré. Dans ce modèle, la surexpression seule du NICD a résulté en une forte activité apoptotique dépendante de p53 dans le cerveau mais n'a pas été suffisante pour induire la formation de tumeurs. La génération de souris déficientes en l'anti-oncogène p53 et surexprimant le N1CD dans le cerveau en développement, a été nécessaire au potentiel tumorigénique de Notch. Les souris ont développé une tumeur du cervelet, le médulloblastome. Cette étude montre de manière homologue au poumon que l'activation de Notch seule n'est pas suffisante pour la formation d'une tumeur à cause de l'importante activité apoptotique induite dans les cellules. L'inhibition de l'apoptose est nécessaire pour promouvoir le potentiel tumorigénique de Notch (Natarajan, Li et al. 2013).

b) Activation de la voie Notch dans les cancers, responsable de la résistance aux traitements

L'activation de la voie Notch dans des cellules souches tumorales permet d'activer leur prolifération (Fan, Khaki et al. 2010) et dans certaines cellules tumorales comme celles du sein, leur dédifférenciation (Lagadec, Vlashi et al. 2012). Ces cellules souches tumorales sont responsables de l'initiation des tumeurs et de leur reprise après traitement du fait de leur résistance aux thérapies

conventionnelles (Chen, Li et al. 2012). Cela a été montré dans un modèle murin de glioblastome, dans lequel les cellules souches neurales ont été repérées par l'expression de la GFP (Green Fluorescent Protein) sous la dépendance du promoteur du gène *nestine*. Le traitement du gliome par une approche de chimiothérapie, a entraîné un arrêt de croissance tumorale et l'émergence d'une sous population de cellules proliférantes marquées par l'étiquette GFP. La greffe *in vivo* de ces cellules a permis la croissance d'une nouvelle tumeur démontrant ainsi le rôle de la cellule souche résistante à la chimiothérapie, dans l'établissement d'un GBM (Chen, Li et al. 2012). De plus, dans des cellules de gliome, le rôle direct de la voie Notch dans la résistance de cellules souches à la chimiothérapie (Ulasov, Nandi et al. 2011) et radiothérapie a été montré (Wang, Wakeman et al. 2010).

Dans l'initiation de tumeurs, dépendante de Notch, il est nécessaire d'avoir des mécanismes d'inhibition de l'apoptose concomitants à la suractivation de Notch. Dans les tumeurs du sein, l'activation de Notch est associée à la résistance à l'apoptose des cellules par deux mécanismes. D'une part, Notch active l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Ferreira, Suriano et al. 2012). D'autre part, la voie de signalisation Notch active la phosphorylation d'Akt de manière dépendante de RBP_κ donc de son activité transcriptionnelle. L'activation d'Akt mène à la dégradation de la protéine pro-apoptotique p53 (Meurette, Stylianou et al. 2009). A cause de ces deux mécanismes dépendants de la voie de signalisation Notch, l'utilisation de thérapies provoquant la mort des cellules par apoptose est très peu efficace sur des cellules tumorales avec une voie Notch active.

L'induction de dommages sur l'ADN par le cisplatine, un agent alkylant, entraîne l'activation de la voie Notch dans les cellules souches d'adénocarcinome du poumon. Après traitement, la population de cellules souches tumorales est amplifiée et la tumeur se reforme tout en devenant résistante aux futures approches de chimiothérapies. L'inhibition pharmacologique de la voie Notch par un inhibiteur du complexe γ -sécrétase a permis de potentialiser le traitement au cisplatine résultant en régression des tumeurs *in vivo* et l'élimination de la population de cellules souches tumorales dans ce modèle d'adénocarcinome du poumon (Liu, Yang et al. 2013).

La radiothérapie est le premier traitement pour les patients atteints de cancers du poumon locaux. La voie de signalisation Notch est activée suite à la radiothérapie pour protéger les cellules de l'apoptose mais de manière indépendante de la phosphorylation d'Akt. Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs de γ -secretase a permis de restaurer la sensibilité des cellules tumorales à la radiothérapie. Néanmoins, les données restent insuffisantes pour savoir si la radorésistance des cellules suite à l'activation de la voie Notch provient de l'inhibition de la mort cellulaire ou de l'amplification des cellules souches au sein de la tumeur (Mizugaki, Sakakibara-Konishi et al. 2012).

Comme l'activation de la voie Notch est associée à la résistance des tumeurs aux thérapies conventionnelles (chimiothérapie et radiothérapie), les approches ciblées peuvent donc être d'un intérêt particulier pour le traitement de tumeurs possédant une voie Notch active. Dans les cancers du poumon, les inhibiteurs de l'EGFR ont montré des résultats convaincants puisqu'ils provoquent une forte réduction de la croissance de la tumeur. Les cellules tumorales vont cependant acquérir une résistance à ce genre de thérapie ciblée. En effet, l'activation de la voie Notch dans le cancer du poumon est associée à la résistance aux inhibiteurs de l'EGFR, mais l'extinction de l'expression du récepteur Notch 1 a restauré la sensibilité des cellules à cette thérapie ciblée (Xie, He et al. 2013).

Dans le domaine des thérapies ciblées, le ciblage de la voie Notch semble être d'un intérêt particulier. Les inhibiteurs de γ -secretase sont très efficaces pour éteindre la voie de signalisation puisque le clivage S3 est une étape indispensable à la génération du domaine intracellulaire de tous les récepteurs Notch (1 à 4) alors que la nécessité du clivage S2 reste discutée. De nombreux inhibiteurs de γ -secretase pour les traitements des cancers sont en cours de tests pour l'utilisation en clinique. Cependant, il existe un inconvénient à cette approche thérapeutique du fait des nombreux effets secondaires dû à l'inhibition de la voie dans les cellules saines. Les molécules actuelles sont donc inutilisables pour le traitement de patients.

En résumé l'activation de la voie de signalisation Notch peut être à l'origine de la transformation tumorale. Dans une tumeur, l'activation de la voie Notch permet la résistance des cellules aux thérapies conventionnelles ou ciblées et promeut l'amplification de la population de cellules souches tumorales responsables de la reprise des tumeurs après traitement. C'est pourquoi l'étude précise des mécanismes mis en jeu lors de l'activation de la voie de signalisation Notch dans les cancers est cruciale pour l'élaboration de nouvelles thérapies ciblées pour le traitement des tumeurs.

IV- La protéine Numb, inhibiteur physiologique de la voie Notch

1° La protéine Numb

La protéine Numb est la première protéine impliquée dans la spécification cellulaire découverte (Uemura, Shepherd et al. 1989). Numb fait partie d'un ensemble de molécules ayant une localisation asymétrique, permettant de définir une polarité cellulaire. Au cours des dix dernières années, il a été montré que la polarité cellulaire est impliquée dans la différenciation. L'expression de Numb a été reliée à l'activation de la voie Notch puisque lors de la division asymétrique des cellules précurseurs des organes sensoriels de la drosophile, l'expression de Numb dans une des cellules filles entraîne l'inhibition de la voie Notch et l'engagement de cette cellule dans une voie de différenciation (Rhyu, Jan et al. 1994). La protéine Numb a été intensément étudiée dans ce système où son rôle est de réguler l'endocytose du récepteur Notch et de son ligand Delta. En plus de son rôle dans l'endocytose, la protéine Numb chez les mammifères est capable de promouvoir la dégradation par ubiquitination de certaines protéines de voies de signalisation clés dans le développement et dans les cancers.

Dans un souci de clarté et du fait de la grande diversité depuis la drosophile jusqu'aux mammifères, Les fonctions et régulations de Numb chez les mammifères seront présentées. Les données obtenues dans un modèle drosophile ne seront abordées que si elles sont nécessaires à la compréhension des mécanismes mettant en jeu Numb.

a) De nombreuses isoformes issues d'un même gène

Deux homologues biologiques du gène *dnumb* (Drosophile) ont été identifiés chez les mammifères, *numb* et *numbl*. Les fonctions de ces deux gènes sont en parties redondantes du fait de leur grande homologie. Aucun phénotype particulier n'a été mis en évidence dans le modèle de souris invalidée pour le gène *numbl* alors que la souris déficiente pour *numb* meurt à E11,5 (11.5 jours après fécondation) montrant l'importance de ce gène par rapport à *numbl* (Zilian, Saner et al. 2001). Les souris doublement invalidées ont un phénotype létal au stade embryonnaire E9, les auteurs ont alors suggéré une certaine redondance de fonction entre *numbl* et *numb* (Petersen, Zou et al. 2004).

Figure 16 : Description des isoformes de Numb, protéines issues de l'épissage alternatif du même ARNm, des délétions sont présentes sur les domaines PTB ou PRR

Le gène Numb, situé sur le chromosome 14 dans le locus q24.2 a été cloné en 1996 (Zhong, Feder et al. 1996). Il est transcrit en un ARNm pouvant être épissé de nombreuses manières (Figure 16). Dans Genbank, 9 séquences de variants d'épissage de l'ARNm de Numb sont présentes mais seulement 6 variant protéiques ont été décrits. Les mécanismes régulant l'épissage alternatif de Numb ne sont pas connus mais certains variants protéiques ont été associés à des localisations et des fonctions précises. La protéine Numb contient deux domaines protéiques particuliers, un domaine PTB (PhosphoTyrosine Binding) et un domaine PRR (Proline Rich Region), chacun impliqués dans des fonctions différentes qui seront détaillées plus loin (Figure 16). Les variants d'épissage de Numb sont issus de délétions dans ces deux domaines. Pour plus de simplicité, les variants de Numb seront notés de 1 à 6 et le numéro de l'isoforme sera précisé autant que possible lors de la description des mécanismes et fonctions associées à la protéine. Numb 1 est une protéine de 651 résidus d'acides aminés avec le domaine PTB situé entre les résidus 33 et 193. Numb 2 a une délétion dans le domaine PRR entre les résidus 366-413, Numb 3 a une délétion des résidus 68-78 du domaine PTB, Numb 4 est une protéine portant les délétions de Numb 2 et de Numb 3 aussi appelée Numb avec un PTB court et un PRR court. Deux isoformes n'ont été décrites que dans le placenta; ce sont Numb 5 avec une délétion des acides aminés 219-316, 366-413, et Numb 6 possédant les trois délétions des autres variants de Numb soit 68-78, 219-316 et 366-413 (Karaczyn, Bani-Yaghoub et al. 2010) (Figure 16). Un dernier variant d'épissage a été identifié dans les cellules de glioblastome (Numb 4d7) mais sera abordé dans le dernier chapitre (page 97) (Jiang, Xing et al. 2012).

b) Structures de la protéine Numb

Jusqu'à ce jour, la structure tridimensionnelle complète de la protéine Numb n'a pas été décrite. Dans la base de données structurales PDB (Protein Data Bank), seule la structure du domaine PTB est présente, obtenue par RMN pour l'homologue de Numb chez la Drosophile. Deux études ont révélé que le domaine PTB (67-211) de Numb peut interagir avec de nombreux partenaires contenant les séquences consensus YIGP(p)YL ou GFNMSFEDFP suggérant une grande adaptabilité du domaine PTB dans l'interaction avec ses partenaires. Les résidus aromatiques semblent importants dans l'interaction bien que le résidu de tyrosine phosphorylé soit dispensable. Le domaine PTB de Numb est capable d'interagir avec des structures en hélice α ou en brin β ce qui montre une grande flexibilité de la protéine rendant difficile la modélisation de ses interactions avec d'autres partenaires protéiques. L'absence de structure complète de la protéine dans la littérature suggère que les domaines non cristallisés sont des domaines non structurés de la protéine (Zwahlen, Li et al. 2000).

2° Numb est une protéine d'endocytose

La première description fonctionnelle de Numb est reliée à l'inhibition de la voie Notch lors de sa ségrégation asymétrique pour la différenciation de cellules précurseurs des organes sensoriels chez la drosophile (Frise, Knoblich et al. 1996). Le phénotype de la perte de Numb chez la drosophile a été reproduit chez les mutants de l' α -Adaptine, un composant du complexe de la Protéine Adaptatrice 2 (AP-2) qui forme le puit de clathrine et lie les protéines cargos aux vésicules de transport. Il a, par la suite, été montré que l' α -Adaptine, agissait entre Numb et Notch dans la détermination du lignage de cellules précurseurs chez la drosophile suggérant un rôle pour Numb dans l'endocytose de molécules (Berdnik, Torok et al. 2002). Chez les mammifères, le rôle de Numb dans l'endocytose a été confirmé et associé à deux fonctions principales, la différenciation cellulaire par l'endocytose des récepteurs Notch et la migration par l'endocytose de molécules d'adhésion.

a) Endocytose des récepteurs Notch par Numb

Numb est un inhibiteur de la voie Notch identifié chez la drosophile lorsque la perte de fonction du gène a résulté en un phénotype identique au gain de fonction de *notch* (Uemura, Shepherd et al. 1989) dans la différenciation des cellules précurseurs des organes sensoriels (Spana and Doe 1996). Le mécanisme d'action de Numb implique l'endocytose du récepteur Notch par une interaction physique entre les deux protéines (Spana and Doe 1996). Néanmoins, l'inhibition de la voie Notch dépendante de Numb semble indépendante du rôle de Numb comme protéine d'endocytose puisque une forme mutante de Numb sur les domaines impliqués dans l'interaction avec l' α -Adaptine ou Epsin (protéines d'endocytose chez la drosophile) reste capable d'inhiber la voie Notch. La délétion de 200 résidus d'acides aminés du domaine PRR (responsable de l'interaction avec les protéines d'endocytose) de Numb n'a pas résulté en la restauration du phénotype d'inhibition de la voie Notch de même que l'inhibition du protéasome pour bloquer l'éventuelle dégradation du récepteur chez la drosophile (Tang, Rompani et al. 2005). Le rôle de Numb dans l'inhibition de la voie Notch, s'est éclairci chez la drosophile par la découverte d'une nouvelle protéine, Sanpodo. Sanpodo est une protéine trans-membranaire indispensable à l'activation de la voie Notch lorsqu'elle est localisée au niveau de la membrane plasmique. Elle agit dans l'internalisation du récepteur activé pour le diriger vers les endosomes contenant le complexe γ -secretase (Upadhyay, Kandachar et al. 2013). Numb en se liant à Sanpodo ou au complexe Sanpodo/Notch inhibe après l'endocytose, le recyclage de Notch à la membrane plasmique et par conséquent inhibe la voie Notch (Cotton, Benhra et al. 2013). Chez les mammifères les mécanismes sont différents car Numb possède une fonction supplémentaire dans

l'ubiquitination du récepteur Notch (page 92) et l'homologue de Sanpodo chez les mammifères, n'a pas encore été identifié.

Lors de l'activation de la voie de signalisation Notch après interaction d'un ligand activé avec son récepteur, celui-ci subit un dernier clivage par le complexe γ -secretase soit au niveau de la membrane plasmique, soit dans les endosomes tardifs/lysosomes qui génère un fragment intracellulaire (NICD), transloqué au noyau pour activer ses gènes cibles. Cette internalisation requiert Numb qui agit comme composant indispensable dans l'initiation de l'endocytose. Le récepteur Notch mono-ubiquitylé recrute les protéines Epsin1 et Eps15 qui servent à initier la courbure de la membrane plasmique (Horvath, Vanden Broeck et al. 2007). Numb interagit par son domaine C-terminal 298-603 avec la protéine Eps15 pour participer à l'internalisation des récepteurs Notch activés (Santolini, Puri et al. 2000) ou non (McGill, Dho et al. 2009). Numb est capable d'interagir avec le complexe AP-2 contenant l' α -Adaptine qui permet la formation du puits de Clathrine. L'interaction entre Numb et l' α -Adaptine se fait par les résidus 564-588 de Numb appelés motif DPF-NPF uniquement dans les puits de Clathrine et les vésicules (Santolini, Puri et al. 2000). Ainsi, la perte d'expression de Numb dans une cellule mène à l'inactivation de la voie Notch dans cette cellule car les récepteurs activés ne sont plus internalisés pour être clivés par le complexe γ -secretase (McGill, Dho et al. 2009). Numb sert aussi d'adaptateur d'endocytose avec le complexe AP-2 pour entraîner le récepteur Notch non lié à un ligand dans sa dégradation dans les lysosomes. Dans les cellules de mammifères, le ciblage de Notch sans ligand dans les lysosomes est réalisé par la polyubiquitination de Notch, par l'enzyme E3 ligase Itch de la famille des E3 ligases à domaine HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus) (Chastagner, Israel et al. 2008; Sorkin and von Zastrow 2009). Numb est régulée par phosphorylation et notamment par la kinase Adaptator-Associated kinase 1 (AAK1) qui régule l'action de Numb dans l'activation de la voie Notch. AAK1 phosphoryle Numb sur le résidu T102 pour induire son relargage du puits de clathrine et sa relocalisation au niveau des endosomes. Cette étape est indispensable à la maturation du puits de clathrine et l'endocytose ne peut pas se terminer sans le relargage de Numb (Sorensen and Conner 2008).

Figure 17 : Mécanisme d'endocytose de la E-Cadhérine par Numb ; Numb interagit avec p120 et recrute les complexes AP2 pour promouvoir l'endocytose de la E-Cadhérine, le complexe de polarité Par3-Par6-aPKC phosphoryle Numb sur 3 résidus d'acides aminés pour induire son relargage dans le cytoplasme et le recyclage de la E-Cadhérine. Adapté selon Sato et al., 2011

b) Endocytose de la E-Cadhérine

L'endocytose et le recyclage de la E-Cadhérine (molécule d'adhérence cellule-cellule) est une étape importante de la migration cellulaire dans les cellules épithéliales. L'internalisation de cette molécule d'adhésion est dépendante du complexe AP2 et de la Clathrine. Numb 4 interagit avec la E-Cadhérine par son domaine 428-592 et recrute le complexe AP2 au niveau des jonctions adhérentes. L'interaction de Numb avec la protéine p120 est une étape indispensable à l'endocytose des E-Cadherine et est régulée par phosphorylation. Numb est phosphorylée sur les résidus 7, 265 et 284 par le complexe de polarité Par3-Par6-aPKC qui inhibe son interaction avec p120 et E-Cadherine (Figure 17). Dans des cellules polarisées, Numb, p120 et E-Cadherine colocalisent au pôle basal suggérant un rôle pour Numb dans la polarisation des cellules régulées par le complexe de polarité Par3-Par6-aPKC au niveau des jonctions serrées et des jonctions adhérentes. Précisément, Numb permet l'internalisation des complexes p120-E-cadherine en recrutant AP2 pour permettre la formation du puits de clathrine. Les endosomes contenant Numb, p120 et E-Cadherine sont recyclés à la membrane. En cas d'activation locale du complexe Par3-Par6-aPKC, l'interaction de Numb avec p120 et E-Cadherine est inhibée ce qui permet le maintien de ces protéines à la membrane et la formation des jonctions adhérentes et des jonctions serrées donc la polarisation de la cellule (Sato, Watanabe et al. 2011). Ce mécanisme est présent lors de la division asymétrique des progéniteurs neuronaux ce qui suggère un rôle de Numb allant au-delà de l'inhibition de la voie Notch dans la différenciation cellulaire. La dérégulation de ce mécanisme est connue dans les cancers au moment de la transition épithélio-mésenchymateuse où Numb pourrait jouer un rôle.

3° Numb est une protéine adaptatrice d'E3 Ubiquitine ligases

a) Protection de TP53 par Numb

Numb a largement été décrite dans son rôle de protéine adaptatrice dans l'endocytose au cours du développement de la drosophile. Une autre fonction de l'homologue de Numb chez les mammifères est le recrutement d'E3 ubiquitines ligases qui sont impliquées dans la dégradation des protéines par la voie lysosomale. Par ces propriétés, Numb contrôle la régulation de la protéine suppresseur de tumeur, p53 qui est une protéine intervenant dans l'apoptose, importante au cours du développement et mutée dans de nombreux cancers.

Figure 18 : Domaines d'interaction de Numb avec ses partenaires protéiques, Le domaine PTB de Numb est relié à sa fonction de dégradation par le recrutement d'E3 ubiquitin ligases, le domaine PRR de Numb est relié à sa fonction d'endocytose par le recrutement des complexes AP2.

La dégradation de cette protéine est assurée par l'E3 ubiquitine ligase HDM2 qui est constitutivement active. Numb, dans une forme phosphorylée, est capable d'interagir avec HDM2 (Juven-Gershon, Shifman et al. 1998) par son domaine PTB (résidus d'acides aminés 113-148). L'interaction HDM2-p53 est dissociée résultant en la protection de p53 de la dégradation (Figure 18). L'utilisation de peptides bloquant l'interaction de Numb avec HDM2-p53 a induit l'apoptose de cellules de cancer du sein et est ainsi une cible thérapeutique potentielle (Colaluca, Tosoni et al. 2008). L'interaction de Numb avec le complexe p53-HDM2 est régulée par méthylation. Set8 est une lysine méthyltransférase ayant pour substrat le domaine PTB de Numb. Cette modification post-traductionnelle inhibe l'interaction Numb-p53 résultant en la dégradation de p53 par HDM2 (Dhami, Liu et al. 2013). Un rétrocontrôle est exercé sur Numb par HMD2 qui est également capable d'ubiquitinyler et de dégrader Numb ce qui suggère une balance entre p53 et la voie Notch par la régulation de la stabilité de Numb dans les cellules (Sczaniecka, Gladstone et al. 2012). Dans cette fonction, Numb n'est pas capable de protéger p53 de la dégradation dépendante de HDM2 (Liu, Lanner et al. 2011).

b) Numb déstabilise la voie Sonic Hedgehog

La voie de signalisation Sonic Hedgehog est une voie importante impliquée la prolifération des cellules progénitrices du système nerveux central. L'interaction d'un ligand Hedgehog avec le récepteur Patched, permet le relargage et la translocation dans le noyau des facteurs de transcription de la famille Gli. L'induction de la dégradation de ces facteurs de transcription induit l'inhibition de la voie de signalisation et des fonctions cellulaires qui lui sont associées. La protéine Numb est impliquée dans la dégradation du facteur de transcription Gli 1 par son interaction avec l'E3 ubiquitine ligase Itch (Figure 18). Le domaine 86-173 de Numb forme un complexe tripartite avec Gli1-Itch pour induire l'adressage de Gli1 dans la dégradation lysosomale après polyubiquitination. Ce mécanisme pourrait être une étape clé de la différenciation de cellules précurseurs du cervelet. De plus, des analyses de transcriptomique ont montré une perte de Numb dans le sous-groupe de médulloblastomes (tumeur du cervelet, OMS grade IV) avec une forte activation de la voie Sonic Hedgehog suggérant une activation constitutive de cette voie par perte de la dégradation de Gli 1 dépendante de Itch (Di Marcotullio, Ferretti et al. 2006). D'un point de vue mécanistique, en l'absence de Numb, Itch est dans une conformation dite fermée où la protéine n'exerce pas son activité d'E3 ubiquitine ligase. L'interaction de Numb avec Itch permet l'ouverture de la conformation de l'enzyme par la dissociation d'une interaction intraprotéique entre les domaines impliqués dans l'interaction avec Gli 1 et dans l'activité enzymatique. Numb joue donc un rôle actif dans la dégradation par ubiquitination de Gli 1 en

activant l'E3 ubiquitine ligase Itch (Di Marcotullio, Greco et al. 2011). La régulation de ce mécanisme d'inhibition de la voie Sonic Hedgehog n'est encore pas connu et il aurait été intéressant de connaître le rôle de la phosphorylation de Numb dans l'interaction avec Itch.

c) Numb, inhibiteur physiologique de la voie Notch

En plus de son rôle dans l'initiation de l'endocytose des récepteurs Notch, Numb régule également le trafic intracellulaire de ces récepteurs par sa fonction de recrutement d'E3 ubiquitine ligases (protéines catalysant la polyubiquitination de protéines pour induire leur dégradation). En effet, l'ubiquitination induit des modifications post-traductionnelles qui permettent après l'endocytose le trafic de nombreux récepteurs dans les endosomes tardifs et les lysosomes (Sorkin and von Zastrow 2009).

Chez les mammifères, Numb est responsable de la dégradation du récepteur Notch dans sa forme membranaire ou après le clivage par le complexe γ -secretase de manière dépendante ou non de la fixation d'un ligand (McGill and McGlade 2003). L'expression de Numb résulte en une grande réduction de l'activité sur le promoteur des gènes cibles de Notch dépendante du domaine PTB de la protéine (McGill and McGlade 2003). La protéine Numb est donc impliquée à la fois dans l'endocytose et la dégradation des récepteurs Notch par des mécanismes indépendants. La localisation de Numb au niveau des endosomes tardifs inhibe le recyclage de Notch (McGill, Dho et al. 2009), l'E3 ubiquitine ligase Itch est recrutée (McGill and McGlade 2003; Chastagner, Israel et al. 2008) puis le récepteur Notch est polyubiquitinylé et dégradé dans les lysosomes (Chastagner, Israel et al. 2008) (Figure 18).

La perte d'expression de Numb, permet au récepteur Notch internalisé, d'être recyclé à la membrane même en présence d'Itch ce qui montre que le rôle d'Itch dans la dégradation de Notch se situe après l'endocytose. Toutes les isoformes de Numb n'ont pas le même rôle à jouer dans la régulation de la voie Notch. Les isoformes de Numb 1 à 4 induisent la dégradation des récepteurs Notch 1 et Notch 2 mais pas de Notch 3 (Notch 4 n'a pas été testé) (Beres, George et al. 2011). Le rôle des isoformes 5 et 6 n'est pas clair car seule l'expression de l'ARNm des ligands de Notch, Jagged 1 et Jagged 2 a été testée ce qui reflète peu le rôle de ces deux protéines sur la voie Notch (Karaczyn, Bani-Yaghoub et al. 2010).

4° La matrice d'endocytose dépendante de Numb dans la division asymétrique

La division asymétrique est le mécanisme par lequel une cellule souche ou progénitrice va se diviser pour donner naissance à deux cellules filles, une cellule identique avec les mêmes caractéristiques de cellule souche, une cellule différenciée avec des capacités de différenciation différentes de la cellule mère. Cet événement est indispensable au développement de l'organisme et met en jeu de nombreux mécanismes moléculaires pour moduler la ségrégation asymétrique de molécules et donc définir le devenir de chacune des cellules filles. Les mécanismes mis en jeu impliquent Numb à tous les niveaux, l'endocytose et le trafic intracellulaire de récepteurs ou protéines d'adhésion, l'ubiquitination et la dégradation de Notch, Gli1 ou p53 et enfin le complexe de polarité Par3-Par6-aPKC qui régule la réorganisation du cytosquelette et le rôle de Numb dans l'endocytose (Figure 19). La division asymétrique a été intensément étudiée donnant lieu à des données contradictoires sur le rôle de Numb qui n'a pas toujours pour fonction la dégradation des récepteurs Notch et qui peut être présent dans les deux cellules lors d'une division asymétrique (Figure 19). Un concept intéressant a émergé récemment permettant d'unir les théories sous le nom de matrice d'endocytose (endocytic matrix). Selon cette théorie, tous les mécanismes décrits dans la division asymétrique existent dans les deux cellules filles et constitue un équilibre dynamique où la décision de l'engagement vers la différenciation ne tient qu'à une faible variation de la concentration d'un ensemble de protéines appelées versatiles (Moonlighting proteins) dont Numb fait partie (Scita and Di Fiore 2010; Pece, Confalonieri et al. 2011). Ces protéines sont capables d'assurer deux fonctions moléculaires distinctes, comme l'endocytose et l'ubiquitination pour Numb (Figure 18), d'une manière extrêmement dynamique. Les nombreux points de régulation de l'expression, la stabilité ou l'affinité de Numb sont donc particulièrement importants pour la division asymétrique (Figure 19).

Figure 19 : Régulation de la division asymétrique par Numb, Voie de signalisation régulées par Numb et impliquées dans la balance autorenouvellement par rapport à la différenciation au cours de la division asymétrique

5° Régulations de Numb

L'activation du promoteur de Numb peut être régulée en réponse à la Nandrolone (hormone analogue à la testostérone) qui active la translocation de la β -caténine au noyau. Le complexe TCF- β -Caténine (complexe transcriptionnel) se fixe en amont du promoteur de Numb pour activer sa transcription. La stimulation par le ligand Wnt3a résulte également en une augmentation de l'activité transcriptionnelle du promoteur de Numb ce qui montre que la voie de signalisation Wnt contrôle l'expression de Numb (Liu, Wu et al. 2013). Sur un modèle de cellules souches embryonnaires en culture, la signalisation Wnt dans une des deux cellules filles lors de la division asymétrique permet d'activer l'expression de gènes de pluripotence alors que la cellule sans voie Wnt est engagée dans la différenciation (Habib, Chen et al. 2013). En supposant que l'expression de Numb a été activée dans la cellule en auto-renouvellement, un autre mécanisme peut réguler l'expression de la protéine pour aboutir à ce phénotype.

La stabilité de l'ARNm de Numb est régulée par la protéine Musashi. L'expression de Musashi dans une des deux cellules lors de la division asymétrique induit l'autorenouvellement de cette cellule, ce qui définit Musashi comme un marqueur d'indifférenciation. Musashi interagit avec l'extrémité 3'UTR de l'ARNm de Numb pour induire sa dégradation donc l'inhibition de l'expression de la protéine Numb alors que le promoteur est bien activé. L'expression de Musashi est reliée à l'activation de la voie Notch donc à la prolifération et à l'autorenouvellement des cellules souches saines ou tumorales (Okano, Kawahara et al. 2005).

Stabilité de la protéine Numb : La stabilité de la protéine Numb est également régulée par HDM2 et d'autres E3 ubiquitines ligases. La protéine LNX (Ligand of Numb), est une E3 ubiquitine ligase ciblant Numb pour la dégradation protéasomale. L'expression de LNX permet de contrer l'inhibition de la voie Notch dépendante de Numb (Nie, McGill et al, 2002). Par ce mécanisme, l'expression de LNX pourrait permettre l'autorenouvellement des cellules souches, le rôle de LNX dans la division asymétrique n'ayant jamais été montré (Chen, Xu et al. 2005). Une autre voie de dégradation de Numb implique l'E3 ubiquitin ligase Siah 1. L'interaction de cette enzyme avec le domaine PTB de Numb entre les acides aminés 92-164 induit sa polyubiquitination et sa dégradation. L'expression de Siah 1 active la voie Notch et induit la dégradation de TP53 dépendante de HDM2 (Susini, Passer et al. 2001).

Numb peut être régulée de manière post-traductionnelle par phosphorylation. De nombreuses kinases sont impliquées dans ce processus qui résulte en la dissociation de l'interaction entre Numb et le complexe AP2 lors de l'initiation de l'endocytose. Les kinases CamK I, CamK II et CamK IV (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein Kinase) phosphorylent Numb sur les résidus S264 et S283. La

protéine phosphorylée n'interagit plus avec AP-2 (Tokumitsu, Hatano et al. 2006) et devient capable d'interagir avec toutes les isoformes des protéines de la famille 14-3-3 par son domaine 238-304 (Tokumitsu, Hatano et al. 2005). Ces protéines ont déjà été impliquées dans la division asymétrique et semblent promouvoir la différenciation des cellules de glandes mammaires (Thomas, Zeps et al. 2011). Dans l'établissement de la polarité, la localisation sub-cellulaire de Numb est régulée par le complexe de polarité Par3-Par6-aPKC qui phosphoryle Numb sur les résidus S7, S265 et S284. Cette phosphorylation inhibe l'interaction de Numb avec les composants de l'endocytose dépendante de la clathrine donc une localisation exclusivement cytoplasmique de Numb (Nishimura and Kaibuchi 2007). Dans le cas de la division asymétrique, le rôle du complexe de polarité Par3-Par6-aPKC est éclairé par des études menées dans un modèle drosophile. L'activation du complexe de polarité active le relargage de Numb dans le cytoplasme. Ce mécanisme est dépendant de l'activation de la kinase Aurora A et permet la localisation membranaire asymétrique de la protéine Numb dans la cellule destinée à la différenciation (Wirtz-Peitz, Nishimura et al. 2008).

Le modèle de division asymétrique chez la drosophile a récemment mis en évidence un nouveau rôle pour Numb dans la régulation des mouvements du centrosome lors de la division cellulaire des cellules souches, indépendante de sa fonction dans l'endocytose et de l'ubiquitination. Le nouveau partenaire de Numb identifié dans cette fonction est l'homologue de CRMP chez la Drosophile. Dans ce modèle l'expression de CRMP a été montrée nécessaire à la voie de signalisation Notch mais pas indispensable puisque les mutants de CRMP ne présentaient pas de défauts de division asymétrique. L'interaction de Numb par son domaine PTB avec CRMP régule les mouvements du centrosome au moment de la télophase de manière dépendante de Cdk5 (Jauffred, Lense et al. 2013).

En résumé, la protéine Numb est régulée dans son expression et son affinité par de nombreux partenaires au cours de la division asymétrique. Tous les événements précédemment décrits sont présents dans les deux cellules filles au cours de la division asymétrique et le devenir de chacune des cellules se fait par un faible déséquilibre de la balance entre d'une part, la fraction de Numb participant à l'endocytose de Notch pour l'activation de la voie de signalisation donc de l'autorenouvellement de la cellule fille. D'autre part, la fraction de Numb qui inhibe les voies Notch, Sonic Hedgehog et permet la stabilisation de p53, ces événements étant impliqués dans la différenciation des cellules au cours de la division asymétrique. CRMP peut jouer un rôle encore non connu chez les mammifères dans la différenciation car chez la drosophile, CRMP en synergie avec Numb régule la voie Notch et les mouvements du centrosome lors de la division asymétrique cellulaire.

6° Numb dans les cancers, au-delà du rôle de suppresseur de tumeurs

Du fait de ses nombreuses fonctions d'inhibition de voies de signalisations impliquées dans la prolifération et l'autorenouvellement des cellules souches, Numb est considéré comme un gène suppresseur de tumeurs. Dans les cancers du sein, la perte de l'expression de Numb est une étape importante dans la progression tumorale (Pece, Serresi et al. 2004) qui est associée à une plus faible survie des patients (Colaluca, Tosoni et al. 2008). Dans ces tumeurs, la voie de signalisation Notch est activée et l'expression de TP53 est perdue, ces événements sont deux marqueurs de faible survie et de résistance aux traitements. De la même manière, l'expression de Numb est délétée dans les cancers du poumon non à petites cellules, correspondant également à une activation de la voie Notch et la perte de TP53 (Westhoff, Colaluca et al. 2009). Ces deux exemples sont le résultat d'une inhibition de l'expression de Numb par un excès de la polyubiquitination de la protéine et de sa dégradation, donc une régulation post-traductionnelle.

Le rôle important de Numb dans la division asymétrique suggère une remise en question du terme qui lui a été donné comme suppresseur de tumeurs. Dans le glioblastome, l'expression de Numb a été montrée dans de nombreuses lignées cellulaires et tumeurs de patients tant au niveau de l'ARNm qu'au niveau de la protéine. La surexpression de Numb dans la lignée cellulaire U87 n'a pas altérée sa capacité à former des tumeurs *in vivo* et n'a pas induit sa différenciation. L'activation de la voie Sonic Hedgehog et l'expression de TP53 n'ont pas été modifiées lors de la surexpression de Numb. La voie de signalisation Notch n'a pas été étudiée car l'expression de Hes1 n'a pas été détectée dans cette lignée cellulaire (Euskirchen, Skaftnesmo et al. 2011). Cette étude montre que Numb peut être exprimée dans un cancer de haut grade remettant en question son activité de suppresseur de tumeur. L'expression de Numb a été analysée dans les cellules souches de glioblastome où l'expression majoritaire de l'isoforme 4 est détectée. Une nouvelle isoforme est identifiée dans ce modèle correspondant à un nouvel épissage alternatif de la protéine. Cette protéine est appelée Numb 4d7 car elle correspond à l'isoforme 4 à laquelle il manque l'exon 7. Ces deux protéines sont localisées de manière asymétrique au cours de la différenciation des cellules souches de glioblastome. Des effets différents ont été observés puisque l'expression de Numb 4 est corrélée avec la diminution de la formation de neurosphères alors que l'expression de Numb 4d7 est corrélée à une augmentation de la taille des neurosphères montrant une prolifération accrue des cellules souches tumorales. Ces effets ont été reliés à l'activation de la voie Notch et la phosphorylation d'Akt qui est inhibée par l'expression de Numb 4 et activée par Numb 4d7. Ces deux isoformes sont capables d'interagir avec le complexe de dégradation ubiquitine ligase FBW7/Cullin1 avec des effets différents puisque Numb 4 induit la dégradation de Notch alors que Numb 4d7 protège Notch. L'analyse transcriptomique des

glioblastomes issus de la classification du TCGA a révélé une corrélation entre la forte expression des ARNm de Numb avec la plus faible survie des patients associées au sous-groupe mésenchymateux, montrant que dans cette tumeur, Numb est associée à un mauvais pronostic indépendant de l'inhibition de la voie Notch (Jiang, Xing et al. 2012).

Introduction des résultats

Le glioblastome est une tumeur agressive du cerveau classée de grade IV selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), la médiane de survie des patients est très faible (12-15 mois) due à la forte résistance de ces tumeurs aux thérapies actuelles (Louis, Ohgaki et al. 2007). L'agressivité de ces tumeurs est reliée à l'hétérogénéité des populations cellulaires qui la compose et donc une réponse différente de ces cellules aux traitements. Parmi ces populations, des cellules souches ont été découvertes dans les GBM (Singh, Hawkins et al. 2004; Lathia, Gallagher et al. 2011) et représentent plusieurs sous-populations (Kahlert, Bender et al. 2012). Elles présentent des caractéristiques de cellules souches normales du développement ou embryonnaires et seraient aussi à l'origine de progéniteurs à prolifération rapide qui forment en partie la masse tumorale (Clarke and Fuller 2006; Dalerba, Cho et al. 2007). Les mécanismes qui sous-tendent cette diversité cellulaire représentent plusieurs facettes de la division asymétrique qui incluent l'auto-renouvellement, la prolifération, et la polarité cellulaire. Parmi les voies de signalisation impliquées dans ces mécanismes la voie Notch représente une voie de signalisation très conservée au cours du développement et souvent perturbée dans les tumeurs, notamment les GBM. En effet, la protéine Notch est exprimée dans les gliomes et joue un rôle critique dans la survie et la prolifération (Purow, Haque et al. 2005).

L'activation de la voie Notch dans les glioblastomes, détectée par l'expression du gène cible *hey1*, est associée à la plus faible survie des patients par une prolifération accrue des cellules tumorales (Hulleman, Quarto et al. 2009). Plus précisément, Notch est impliquée dans le maintien d'une population de cellules souches tumorales in vivo (Shih and Holland 2006) par le contrôle de la division asymétrique où la présence de Notch résulte en l'autorenouvellement de la cellule fille (Nteliopoulos and Gordon 2012). Le blocage de cette voie par un inhibiteur pharmacologique a résulté en l'élimination de cette population de cellules souches tumorales (Fan, Matsui et al. 2006) et de la croissance d'un modèle de glioblastome in vivo (Fan, Khaki et al. 2010). De plus, l'activation de Notch est reliée à la résistance des glioblastomes aux approches de thérapies conventionnelles comme la chimiothérapie (Ulasov, Nandi et al. 2011) ou la radiothérapie (Wang, Wakeman et al. 2010) comme aux approches de thérapie ciblée utilisant des anticorps bloquants anti-VEGF (Li, Sainson et al. 2011). L'activation de la voie Notch nécessite un contact cellule-cellule pour l'interaction d'un ligand Delta/Jagged sur un récepteur Notch. L'activation du récepteur est suivie d'un clivage extracellulaire par une métalloprotéase (ADAM 10) provoquant la dissociation du domaine extracellulaire du récepteur. Le domaine intracellulaire est ensuite clivé par le complexe γ -secretase à la membrane plasmique ou lors de son trafic intracellulaire (Bray 2006). Ce fragment clivé est transloqué au noyau où il va promouvoir l'expression de ses cibles comme la Cycline D1 (Xu, Qiu et al. 2010), Hes1 et Hey1 (Krejci and Bray 2007). Ces protéines sont impliquées dans la prolifération des cellules par le passage de la transition G1/S (Fan, Khaki et al. 2010; Xu, Qiu et al. 2010). Un des mécanismes d'inhibition de la

voie Notch implique l'adressage des endosomes contenant les récepteurs Notch dans la dégradation lysosomale résultant en leur élimination dans la cellule et la perte de l'activation des gènes cibles de voie. Cette étape met en jeu l'E3 ubiquitine ligase Itch qui catalyse la polyubiquitination du récepteur Notch activé ou non et sa dégradation (Qiu, Joazeiro et al. 2000; Chastagner, Israel et al. 2008). Cette étape nécessite l'expression de Numb.

Numb est l'inhibiteur physiologique de la voie de signalisation Notch. Au cours de la division asymétrique, l'expression de Numb dans une des deux cellules fille résulte en l'inhibition de la voie Notch et l'engagement de cette cellule vers la différenciation (Spana and Doe 1996). D'un point de vue mécanistique, Numb est indispensable à deux étapes distinctes de la voie de signalisation Notch. Au niveau de l'internalisation des récepteurs Notch par son domaine PRR (Proline Rich Region) médiant l'interaction avec les protéines d'endocytose AP2 et Eps15 (Santolini, Puri et al. 2000), et pour la dégradation lysosomale des récepteurs Notch par le recrutement, sur son domaine PTB (PhosphoTyrosine Binding motif), de l'E3 ubiquitine ligase Itch (Di Marcotullio, Ferretti et al. 2006; Chastagner, Israel et al. 2008). Numb est exprimée dans les cellules souche de glioblastome où sa fonction d'endocytose des récepteurs Notch est assurée mais pas sa fonction de dégradation de ces récepteurs par Itch (Jiang, Xing et al. 2012).

La voie de signalisation de Notch et sa régulation par Numb restent encore peu explorées dans les GBM. Notch est associée à la prolifération et l'autorenouvellement des cellules souches de glioblastome alors que la protéine Numb, est exprimée dans ces mêmes cellules et ne joue pas son rôle d'inducteur de la dégradation des récepteurs par Itch. La connaissance des mécanismes de régulation de la voie Notch et de Numb pourraient apporter une meilleure compréhension de la biologie des cellules souches qui prolifèrent dans les glioblastomes.

Les Collapsin Response Mediator Proteins (CRMPs) font partie d'une famille de protéines qui participent à la morphogénèse du système nerveux du fait de leur implication cellulaire dans le remaniement du cytosquelette (Kimura, Watanabe et al. 2005). Au laboratoire, CRMP5 par sa liaison avec la tubuline, a été décrit comme antagoniste de l'action d'un autre membre de la famille des CRMPs, CRMP2, et acteur de la polarité neuronale (Brot, Rogemond et al. 2010). Par ailleurs, CRMP2 dans l'élongation axonale, en se liant à Numb participe à l'endocytose et le recyclage d'une molécule d'adhésion L1 au niveau du cône de croissance (Nishimura, Fukata et al. 2003).

La protéine CRMP5 est aussi exprimée dans les précurseurs nerveux en développement (Ricard, Rogemond et al. 2001; Charrier, Reibel et al. 2003) et dans les zones de neurogénèse chez l'adulte (Veyrac, Giannetti et al. 2005; Veyrac, Reibel et al. 2011). En pathologie tumorale, il a été démontré que CRMP5 était un marqueur des tumeurs neuroendocrines du poumon de haut grade

(Meyronet, Massoma et al. 2008). Dans le cas du glioblastome, l'expression des messagers *dpysl5* (CRMP5) a été décrite dans un cluster de gènes associés à la prolifération et reliés à une plus faible survie des patients (Liang, Diehn et al. 2005). Une isoforme courte de CRMP5 localisée dans le noyau des cellules de glioblastome a été reliée à la prolifération dans un modèle de neuroblastome *in vitro* (Brot, Malleval et al. 2013).

Le rôle de Notch et CRMP5 dans la prolifération et la survie des patients atteints de GBM et le lien de CRMP2 avec la voie Notch par l'intermédiaire de son inhibiteur Numb, a suscité une exploration du rôle de CRMP5 dans la voie de signalisation de Notch en relation avec la prolifération.

Mon travail de thèse a été de démontrer le rôle fonctionnel et mécanistique de la protéine CRMP5 dans la prolifération des cellules de GBM par la voie Notch. Ce travail s'est élargi par une étude réalisée par le Dr David Meyronet, sur des biopsies de GBM provenant d'une cohorte rétrospective de 183 spécimens (2004-2008). Au cours de cette étude 23/183 biopsies ont présentées une expression faible de CRMP5 tandis que 160/183 révèlent une expression forte de CRMP5 en relation avec une plus faible survie des patients.

La première partie du travail de thèse (II Résultats préliminaires) a consisté en la détection l'expression de CRMP5 dans un modèle de cellules souches de glioblastome *in vitro*. La protéine est perdue au cours de la différenciation de ces cellules. Un effet de CRMP5 a été recherché par délétion de la protéine dans modèle de croissance de cellules de GBM transplantées chez la souris. Enfin, sur des cellules de GBM en culture, j'ai mis en évidence un rôle direct de la protéine CRMP5 sur la voie Notch dans la prolifération cellulaire. Pour montrer une éventuelle synergie de CRMP5 et Notch dans les tumeurs, l'expression de Notch dans les GBM exprimant fortement CRMP5 a été recherchée et observée dans les mêmes zones au sein d'une tumeur. Ces résultats préliminaires, proposent une synergie entre CRMP5 et la voie Notch dans les glioblastomes.

La deuxième partie de ce travail fait l'objet de l'article (III Premier article : CRMP5 controls glioblastoma cell proliferation and survival through Notch-dependent signaling)

Dans cet article, nous avons montré l'expression protéique cytoplasmique et nucléaire de CRMP5 dans divers modèles de glioblastome (lignées cellulaires, neurosphères, xénogreffe, tumeurs humaines). Deux motifs d'expression de CRMP5 (faible et hétérogène ou forte et homogène) ont été identifiés chez les patients, et reliés à leur survie. Les glioblastomes exprimant fortement CRMP5 ont une prolifération intrinsèque accrue comparé aux tumeurs exprimant faiblement CRMP5. Ce nouveau rôle de CRMP5 dans la prolifération a été confirmé *in vitro* et relié au passage de la transition G1/S au cours du cycle cellulaire. L'activation de la voie Notch a été montrée dépendante de l'expression de CRMP5 tant au niveau de l'expression des récepteurs Notch qu'au niveau de l'activité

transcriptionnelle sur les gènes cibles. De même, l'activation d'Akt est montrée dépendante de l'expression de CRMP5 in vitro. Ces résultats obtenus in vitro sont renforcés par l'analyse de glioblastomes humains dans lesquels, la forte expression (localisation cytoplasmique) et activation (localisation nucléaire) de Notch 1 et Hes 1 a été montrée dans les tumeurs exprimant fortement CRMP5. Enfin, l'étude mécanistique révèle un rôle encore inconnu de la protéine CRMP5 qui empêche l'adressage des récepteurs Notch vers la dégradation lysosomale Numb-dépendante induite par l'E3 ubiquitine ligase Itch.

Un résultat complémentaire à cet article montre que le contrôle d'Akt par CRMP5 n'est pas applicable aux cibles d'Akt les protéines mTor et p70S6K.

Un deuxième article (IV second article : CRMP5 protects Notch against Numb-mediated degradation thereby promoting Glioblastoma proliferation) en préparation s'attache à montrer le mécanisme par lequel CRMP5 lie Numb pour protéger le récepteur Notch de la dégradation lysosomale. Au cours de ce travail, l'expression de Numb dans divers modèles de glioblastome a été vérifiée (lignées cellulaires, neurosphères). L'expression de Numb accompagnée d'une voie de signalisation Notch active a été observée dans des cellules exprimant CRMP5 de manière endogène, montrant que dans ce modèle, Numb ne joue pas son rôle dans la dégradation des récepteurs Notch. Pour aller plus loin, le rôle direct de CRMP5 dans l'inhibition de la dégradation de Notch dépendante de Numb a été montré. Cet effet est médié par une interaction entre CRMP5 et Numb qui dissocie l'interaction entre Numb et Notch résultant en l'activation constitutive de cette voie dans les glioblastomes. Le domaine précis d'interaction entre les deux protéines a été abordé et localisé sur le domaine PRR de Numb.

L'ensemble de ces résultats montrent un nouveau rôle pour CRMP5 dans la prolifération des glioblastomes par l'activation de la voie Notch et d'Akt. Cette fonction est reliée à une nouvelle interaction protéique entre CRMP5 et Numb qui protège les récepteurs Notch de la dégradation. Ce mécanisme permet une meilleure compréhension de la biologie des cellules proliférantes au sein des glioblastomes.

Results introduction

Glioblastoma (GBM) is a highly aggressive brain tumor graded IV by the World Health Organization (WHO). Patients overall survival is very poor of about 12-15 month due to strong resistance of the tumors to actual therapies (Louis, Ohgaki et al. 2007). Cancer cells populations heterogeneity results in different responses to treatments resulting in tumor resistance and recurrence after treatments. Among these cell populations, cancer stem cells were discovered in glioblastomas (Singh, Hawkins et al. 2004; Lathia, Gallagher et al. 2011) and found organized in several populations with distinct sensibility to therapies (Kahlert, Bender et al. 2012). These cells present normal or embryonic stem cell characteristics and could be the origin of highly proliferating progenitors which represent the most part of the tumor (Clarke and Fuller 2006; Dalerba, Cho et al. 2007). Mechanisms under this cellular diversity include several facets of asymmetric division as self-renewal and proliferation. Several signaling pathways are of interest in these mechanisms and particularly the Notch signaling pathway which is highly evolutionary conserved, frequently deregulated in tumors, especially glioblastomas. Notch signaling components are highly expressed and active in gliomas which is critical for proliferation and survival of tumoral cells. (Purow, Haque et al. 2005).

Notch signaling pathway activation detected by Notch target gene *hey 1* expression, is related to poor survival of the patient by an increased tumor cells proliferation (Hulleman, Quarto et al. 2009). Notch signaling has been involved in different processes of Glioblastoma cell growth. In fact, Notch is implicated in tumoral stem cell maintenance *in vivo* (Shih and Holland 2006) by control of asymmetric division where Notch activation promotes self-renewal of a daughter cell (Nteliopoulos and Gordon 2012). Inhibition of this pathway using a pharmacological inhibitor resulted in tumor stem cells depletion (Fan, Matsui et al. 2006) and growth arrest in a glioblastoma model *in vivo* (Fan, Khaki et al. 2010). Furthermore, Notch activation is related to glioblastoma resistance to conventional therapies like chemotherapy (Ulasov, Nandi et al. 2011) or radiotherapy (Wang, Wakeman et al. 2010) as well as targeted therapies using anti-VEGF blocking antibodies (Li, Sainson et al. 2011). Notch signaling pathway activation is achieved by a cell-cell contact providing transmembrane Delta/Jagged ligand expressed at signal-sending cell surface to a Notch receptor at the signal-receiving cell surface. Notch receptor is extracellularly cleaved by a metalloprotease (ADAM 10) then internalized by a Clathrin-dependent-endocytosis, and activated by a γ -secretase cleavage during its intracellular trafficking (Bray 2006) resulting to its nuclear translocation. There, the activated Notch interacts with RBPjk transcription factor to activate the target genes like *CCND1* (Cyclin D1) (Xu, Qiu et al. 2010), *hes 1* and *hey 1* (Krejci and Bray 2007). These proteins are implicated in tumoral cell proliferation by promoting G1 to S cell cycle phase transition and stem cell self-renewal (Fan, Khaki et al. 2010; Xu, Qiu et al. 2010). Notch signaling inhibition could be achieved by the targeting of Notch containing endosomes to

lysosomal degradation resulting in a total loss of target genes expression. This step is dependent of the E3 ubiquitin ligase Itch which catalyzes activated or non-activated Notch receptor polyubiquitination and degradation (Qiu, Joazeiro et al. 2000; Chastagner, Israel et al. 2008). Numb is an essential protein for Notch inhibition.

Numb is the physiological Notch signaling pathway inhibitor. During asymmetric division, Numb expression in one of the two daughter cells results in Notch inhibition and commitment into differentiation (Spana and Doe 1996). From a mechanistic point of view, Numb acts at two independent steps of Notch signaling pathway. First during Notch receptor endocytosis, Numb recruits endocytosis adaptors Eps15 and AP2 complex by its PRR domain (Proline Rich Region) and participates to constitutive Notch internalization (Santolini, Puri et al. 2000). Second, Numb recruits the E3 ubiquitin ligase Itch on its PTB domain (PhosphoTyrosine Binding motif) promoting Notch receptors lysosomal degradation (Di Marcotullio, Ferretti et al. 2006; Chastagner, Israel et al. 2008). Numb expression in glioblastoma was identified in cancer stem cells where it participates in Notch endocytosis but not in Notch degradation by Itch (Jiang, Xing et al. 2012).

Notch signaling pathway and its regulation by Numb are poorly studied in glioblastomas. It has been reported in GBM stem cells implication of Notch in proliferation and self-renewal; however, Numb protein is expressed in the same cells and does not promote Notch degradation by the E3 ubiquitin ligase Itch. In other GBM primary cultured cells, or GBM cell lines the interplay between Notch and Numb has not been explored. A better knowledge of the mechanisms underlying Notch regulation by Numb will be of interest for understanding the biology of glioblastoma proliferation.

The Collapsin Response Mediator Proteins (CRMP) were described first in semaphorine 3A signaling during axonal pathfinding (Goshima et al, 1995); then, they were implicated in cytoskeleton remodeling during the central nervous system morphogenesis (Kimura, Watanabe et al. 2005). Among CRMPs, CRMP5 protein was isolated and cloned from serum of patients with neurological paraneoplastic diseases (Honnorat J, et al. 1996 ; Honnorat J, et al. 1998 ; Ricard D, et al. 2001).

In the laboratory, CRMP5, was described by its interaction with tubulin as an antagonist of another protein of the family, CRMP2 and an actor in neuronal polarity (Brot, Rogemond et al. 2010). Otherwise, CRMP2 interacts with Numb to participate in endocytosis and recycling of L1-CAM adhesion molecule during axon growth (Nishimura, Fukata et al. 2003).

CRMP5 is expressed in neural precursors during embryonic development (Ricard, Rogemond et al. 2001; Charrier, Reibel et al. 2003) and in adult neurogenesis zones (Veyrac, Giannetti et al. 2005; Veyrac, Reibel et al. 2011). In a tumoral context, we identified CRMP5 expression as a marker of high grade neuroendocrine small cell lung tumors (Meyronet, Massoma et al. 2008). Concerning

glioblastoma, CRMP5 mRNA expression was identified in gene cluster associated with proliferation and poor survival of patients (Liang, Diehn et al. 2005). Furthermore, a short CRMP5 isoform localized in glioblastoma cancer cells nucleus was found related to proliferation in a neuroblastoma model in vitro (Brot, Malleval et al. 2013).

Notch and CRMP5 relation with glioblastoma proliferation and patient's survival on one hand and CRMP2 relation with the Notch inhibitor Numb on the other hand, suggested a direct role for CRMP5 in glioblastoma proliferation through regulation of Notch signaling pathway by Numb.

My thesis work was to demonstrate a functional and mechanistic effect of CRMP5 in glioblastoma proliferation in Notch signaling pathway. This work was supported by a translational study on human glioblastoma biopsies from a retrospective cohort of 183 specimen (2004-2008) by Dr. David Meyronet. This work revealed a low or negative CRMP5 expression in 23/183 biopsies while 160/183 specimen presented high CRMP5 expression related to patient's poorer survival.

First part of the thesis work (I preliminary results) consisted in CRMP5 expression analysis in a glioblastoma stem cell in vitro model. CRMP5 loss of expression during differentiation was observed. An effect of CRMP5 was investigated by depletion of the protein in an in vivo GBM growth model. Finally, on glioblastoma cells in culture, a direct effect of CRMP5 on Notch signaling pathway and proliferation was identified. To further investigate a synergy between CRMP5 and Notch in human glioblastoma, Notch expression was examined in high CRMP5 expressing tumors and observed in the same areas. These preliminary results suggest a new role for CRMP5 in Notch signaling pathway activation and proliferation in glioblastomas.

Second part of this work is the aim of the article (II **Premier article**: CRMP5 controls GBM proliferation and survival through a Notch dependent-signaling)

In this article, we demonstrate cytoplasmic and nuclear CRMP5 protein expression in several glioblastoma models (cell lines, xenograft and Human tumors). Two expression patterns were identified in patients and correlated to survival. Highly CRMP5 expressing glioblastomas showed increased intrinsic proliferation compared to low CRMP5 expressing glioblastomas. This new function for CRMP5 in proliferation was confirmed in vitro and related to G1/S cell cycle phase transition. Notch signaling pathway activation was demonstrated dependent of CRMP5 expression at the receptor level and also on Notch target genes transcriptional activation. Furthermore, Akt activation was found also dependent of CRMP5 in vitro. Those results are enlightened by clinical study were high Notch 1 and Hes 1 expression (cytoplasmic) and activation (nuclear localization) was showed in highly CRMP5 expressing glioblastomas. Finally, a mechanistic study demonstrate an unknown function for CRMP5 by repressing Notch receptors targeting to lysosomal degradation by the E3 ubiquitin ligase Itch.

A complementary result to this article shows that CRMP5 controls Akt activation but not activation of its targets, the proteins mTor and p70S6K.

The second article (III **Second article**: CRMP5 protects Notch against Numb-mediated degradation thereby promoting Glioblastoma proliferation) in preparation, demonstrates the mechanism by which CRMP5 interacts with Numb to protect Notch receptor from lysosomal degradation. During this work, Numb expression in several glioblastoma models (cell lines, neurospheres) was detected. Numb expression was found in cells expressing CRMP5 endogenously and with an active Notch signaling pathway, showing in this model, a failure for Numb to target Notch receptors to lysosomal degradation. To go further, CRMP5 direct role on Numb-dependent Notch degradation inhibition was demonstrated mediated by a new protein-protein interaction between CRMP5 and Numb which abolishes Numb-Notch interaction resulting in constitutive Notch signaling pathway activation in glioblastomas. Interaction domain between the two proteins was uncovered and localized on Numb PRR domain.

Taken together these results show a new role for CRMP5 in glioblastoma proliferation by Notch signaling pathway and Akt activation. This function is related to a new interaction identified between CRMP5 and the Notch inhibitor Numb which protects Notch receptors from lysosomal degradation. This mechanism allows a better understanding of the biology of glioblastoma proliferating cells.

Résultats

CRMP5 and Notch receptors expression in glioblastoma stem cells

Figure 20 : A : Western Blot des cellules issues de xénogreffe de glioblastome (xenograft 1) en conditions de neurosphères (NS) ou en conditions de cellules différenciées (Diff). CD133 et MSI1 sont des marqueurs de cellules souches perdus au cours de la différenciation, GAPDH est utilisé comme témoin de charge ; B : Western Blot des cellules issues de xénogreffe de glioblastome (xenograft 2) en conditions de neurosphères (NS) ou en conditions de cellules différenciées (Diff). Sox 2 est un marqueur de cellules souches perdu au cours de la différenciation, Actine est utilisé comme témoin de charge. CRMP5 est détecté par un anticorps polyclonal. Notch 1 et Notch 2 sont détectés par des anticorps monoclonaux spécifiques des formes membranaires ou clivées (activées) des récepteurs.

I- Preliminary results

a) CRMP5 et cellules souches.

Notch est un marqueur de cellules souches (Shih and Holland 2006) et dans les GBM la voie Notch est impliquée dans le maintien et la prolifération de la population de cellules souches tumorales (Fan, Khaki et al. 2010). Par une étude en western blot à partir d'une lignée de cellules souches (NS END générée par le laboratoire du Pr. D. Figarella-Branger) nous montrons une expression forte de la protéine dans ces cellules (Figure 1 B, article). Afin de déterminer si l'expression de CRMP5 est liée à l'état souche des cellules, nous avons caractérisé CRMP5 dans les cellules souches de glioblastome et dans ces cellules différenciées, cultivées pendant 7 jours dans un milieu en présence de sérum (SVF) et sans facteurs de croissance (bFGF+EGF). A partir d'un modèle du laboratoire, chez la souris nude, obtenu par transplantation de GBM humains (xénogreffe 1 ; xénogreffe 2) et culture des cellules par la technique de neurosphères, nous montrons en western blot que la protéine CRMP5 est exprimée par la population de cellules souches tumorales issues de deux modèles de glioblastome différents (Figures 20 A et B) identifiée par les marqueurs CD133, Musashi (MSI1) et Notch1, Notch2 ou Sox2. Dans le milieu de différenciation, l'expression des marqueurs de cellules souches est perdue comme attendu, et on remarque que l'expression de CRMP5 s'éteint (Figures 20 A et B).

These results show in two glioblastoma stem cell models, the specific CRMP5 expression in stem cells lost during differentiation. Concomitant CRMP5 and Notch receptors expression is observed and suggest a functional link to uncover.

Modèle de prolifération cellules de glioblastome déficientes pour CRMP5

Figure 21 : **A :** Analyse en WB de l'expression de CRMP5 dans les cellules GL15 transfectées par différents shRNA (1 à 4) dirigés contre CRMP5. Les cellules transfectées ont été lysées après quatre jours d'expression du shRNA ; **B :** Cinétique de croissance des cellules GL15 shRNA CRMP5, GL15 Empty Control et GL15 shRNA Scrambled par comptage cellulaire ; **C :** Index de prolifération de la lignée GL15 et des lignées stables shRNA CRMP5, Empty Control et shRNA Scrambled, après 24h de culture, par incorporation du BrdU révélé par immunocytofluorescence avec un anticorps anti-BrdU et le DAPI qui marque les noyaux ; **D :** Analyse en western blot de la forme membranaire et clivée du récepteur Notch 1. Gamme de concentrations de 12,5 à 125µM, le DMSO est utilisé comme témoin car c'est le solvant dans lequel est dilué l'inhibiteur ; **E :** Effet des concentrations de DAPT (12,5 à 125µM) sur l'index de prolifération des cellules GL15, après 2h de contact. Dans le contrôle du DMSO est utilisé ; **F :** Analyse de l'index de prolifération dans les lignées GL15, Empty, Scrambled et CRMP5 KD traitées par inhibiteur de γ-secretase (50µM) ou contrôle DMSO pendant 2h. Résultats de 2 expériences reproductibles.

b) Génération et caractérisation de cellules de GBM déficientes pour CRMP5

- Génération de cellules de GBM déficientes en CRMP5

Dans l'objectif de observer *in vivo* le rôle de CRMP5 dans la croissance des glioblastomes, des lignées GL15 réprimant de manière stable l'expression de CRMP5 ont été générées par transfection et sélection clonale. Quatre constructions de shRNA ont été évaluées pour leur efficacité à réprimer l'expression de CRMP5 par rapport aux contrôles avec un shRNA non-spécifique (Scrambled) et le plasmide vide (Empty). Des cellules GL15 ont été transfectées transitoirement par les différents plasmides, l'expression de CRMP5 est détectée par western blot. Les contrôles correspondant aux cellules GL15 transfectées par le plasmide contenant un shRNA non-spécifique (Scrambled) ou le plasmide vide (Empty) montrent que les conditions de transfection n'affectent pas l'expression de la protéine CRMP5 (Figure 21 A). La construction 3 semble inefficace, tandis que les constructions 2 et 4 répriment fortement l'expression de CRMP5 (Figure 21 A). Ces constructions sont sélectionnées pour réaliser les transfections stables des cellules GL15.

Les lignées GL15 transfectées stables sont établies par transfection et sélection clonale. Dans un premier temps, les lignées GL15 transfectées stables avec les plasmides contrôles (Empty, Scrambled) et le plasmide contenant le shRNA 2 CRMP5 sont générées, la lignée GL15 transfectée par le plasmide contenant le shRNA 4 reste à faire.

- Croissance in vitro des cellules de GBM déficientes en CRMP5 La croissance de ces lignées a été analysée par comptage cellulaire pour déterminer leur temps de doublement. Le résultat de 2 expériences indépendantes montre que la lignée GL15 d'origine a un temps de doublement de 23h tandis que la lignée shRNA CRMP5 a un temps de doublement de 44h soit une diminution de prolifération de 57% (Figure 21 B). Les lignées stables contrôles ont des temps de doublement de 45h pour la lignée Empty et de 48h pour la lignée shRNA Scrambled (Figure 21 B). La lignée shRNA CRMP5 prolifère moins vite que la lignée GL15 d'origine. Les lignées stables contrôles (Empty et shRNA Scrambled) ont une croissance équivalente à celle de la lignée CRMP5 KD.

Caractérisation des cellules de glioblastome déficientes pour CRMP5 isolées par tri cellulaire

Figure 22 : **A :** Analyse par cytométrie en flux et tri des cellules les plus fortement transfectées sur la base de l'intensité de fluorescence de la RFP (Red Fluorescent Protein), shRNA Scrambled est un contrôle non-spécifique, shRNA CRMP5 (1 et 2) correspond à la répression de l'expression de la protéine ; **B :** Expression de la RFP comme témoin de transfection sur les cellules triées après une semaine de mise en culture en conditions de sélection par la puromycine. Le DAPI marque les noyaux **C :** Western Blot d'analyse de l'expression de CRMP5 dans les cellules GL15 transfectées par les plasmides exprimant les shRNA indiqués, 7 jours de culture après tri, l'actine est le témoin de charge ; **D :** Western Blot d'analyse de l'expression de CRMP5 dans les cellules GL15 transfectées par les plasmides exprimant les shRNA indiqués, 7 jours plus tard donc 14 jours de culture en conditions de sélection après tri cellulaire, l'actine est le témoin de charge. CRMP5 est réexprimée dans toutes les lignées shRNA CRMP5. Le tri cellulaire sur la base de la fluorescence de la RFP a été réalisé 3 fois avec des résultats identiques.

Pour analyser plus finement la prolifération des lignées stables, la technique d'incorporation du BrdU en phase S du cycle cellulaire a été utilisée. L'index de prolifération de la lignée GL15 d'origine est de 41% et celui de la lignée shRNA CRMP5 de 30% soit une réduction de 30% de prolifération de la lignée déplétée en CRMP5 par rapport à la GL15 (Figure 21 C). La lignée GL15 contrôlée transfectée de manière stable par le plasmide vide à un index de prolifération de 35% et le contrôle shRNA Scrambled de 24% (Figure 21 C). Ces deux lignées contrôles ne sont pas équivalentes entre elles ni avec la lignée GL15. Ces résultats montrent par deux approches différentes que CRMP5 joue un rôle dans la prolifération des glioblastomes seulement les lignées GL15 transfectées stable contrôles semblent avoir été altérées dans le processus de sélection clonale.

-Prolifération des cellules déficientes en CRMP5 en présence de l'inhibiteur de la voie Notch

La voie Notch active la prolifération des glioblastomes (Fan, Khaki et al. 2010). L'inhibition de cette voie par des inhibiteurs de γ -secretase résulte en une diminution drastique de la prolifération des cellules tumorales. Le DAPT est un inhibiteur efficace du complexe γ -secretase utilisable sur culture de cellules. Dans la lignée GL15 les conditions d'utilisation (concentration et temps de contact) de cet inhibiteur ont été optimisées, vérifiées par Western Blot (Figure 21 D) pour l'expression du récepteur Notch1 clivé (Notch 1 IC) et par l'index de prolifération pour l'impact sur la prolifération (Figure 21 E). Un effet dose est observé pour la gamme de concentrations que nous avons utilisée, un temps de contact de 2h avec 50 μ M d'inhibiteur (DAPT) a été suffisant pour faire disparaître, en western blot, le signal Notch1 IC (Figure 21 D) et diminuer de 50% la prolifération des cellules GL15 (Figure 21 E).

Dans la lignée GL15-shRNA CRMP5, l'effet de l'inhibition de la γ -secrétase (DAPT, 50 μ M ; 2h de contact) ne montre aucun effet sur l'index de prolifération (Figure 2 F). Après traitement, l'index de prolifération des lignées GL15, Empty et Scrambled est diminué de 50% ou plus avec l'inhibiteur de l'activation du récepteur Notch (Figure 21 F). La voie de signalisation Notch est donc inhibée constitutivement dans la lignée stable GL15 shRNA CRMP5 et la prolifération résiduelle observée est indépendante de cette voie de signalisation. Ces résultats confirment l'implication de CRMP5 dans la prolifération des cellules de glioblastome par rapport à la lignée GL15 d'origine. Les lignées stables contrôles transfectées par le plasmide vide ou le plasmide contenant un shRNA non spécifique, ont une prolifération réduite par rapport à la lignée GL15 d'origine (Figure 21 F) montrant que les cellules ont été altérées par le processus de sélection clonale ou que le shRNA non spécifique est en fait délétère pour la cellule. Pour résoudre ce problème une autre séquence de shRNA contrôle a été utilisée et une lignée générée par la même méthode de sélection clonale. Cette nouvelle lignée a eu des caractéristiques similaires aux deux autres lignées stables contrôles ce qui montre une altération forte des cellules pendant le processus de sélection clonale.

CRMP5 and Notch 1 expression in human glioblastoma

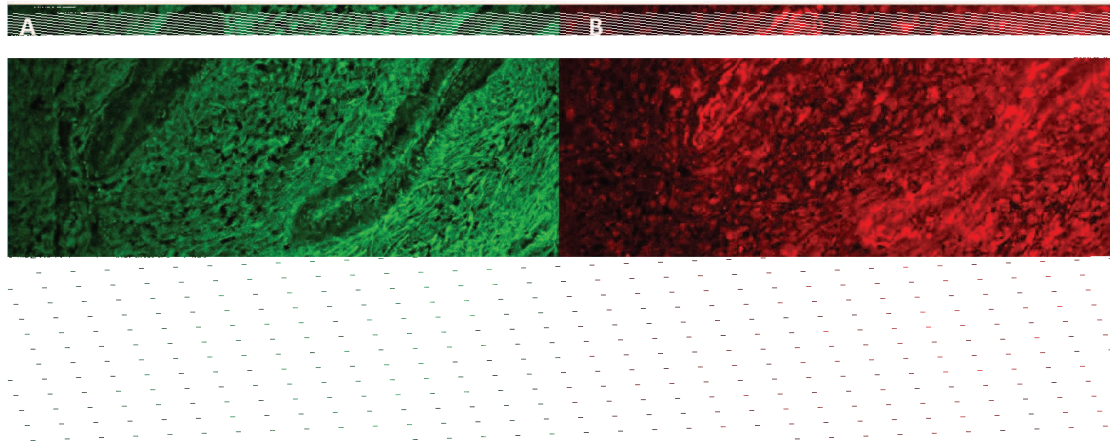


Figure 23 : **A :** Analyse au microscope confocal (20x) de l'expression de CRMP5 (Vert) détectée par un anticorps spécifique dans un glioblastome humain ; **B :** Analyse au microscope confocal (20x) de l'expression du récepteur Notch 1 (rouge) détectée par un anticorps spécifique des formes membranaire et nucléaire, dans la coupe suivante (épaisseur 12 μm) de la même tumeur humaine ; **C :** Superposition du marquage CRMP5 (vert) avec le DAPI qui montre l'organisation des noyaux cellulaires dans la tumeur ; **D :** Superposition du marquage Notch 1 (rouge) avec le DAPI dans la même coupe sériée (épaisseur 12 μm) d'un glioblastome humain. Les barres d'échelle représentent 50 μm dans la tumeur

Une nouvelle approche a été envisagée pour générer des lignées GL15 avec une répression stable de l'expression de CRMP5. Les mêmes plasmides ont été utilisés et transfectés dans les cellules. Les cellules transfectées ont été sélectionnées par tri cellulaire (Figure 22 A) sur la base de leur intensité de fluorescence de la RFP (Red Fluorescent Protein). Les cellules les plus transfectées ont été sélectionnées (Figure 22 A) pour les trois constructions (shRNA Scrambled, shRNA CRMP5-1 et shRNA CRMP5-2) puis remises en culture avec l'antibiotique de sélection (Puromycine) afin de les préparer à l'implantation orthotopique pour étudier la croissance *in vivo* de glioblastome dépendante de CRMP5 (Figure 22 B). La bonne répression de CRMP5 a été vérifiée par Western Blot et montrée efficace pour les cellules obtenues après le tri cellulaire (Figure 22 C). Après une semaine de culture, un deuxième western Blot a été réalisé pour vérifier que la répression de CRMP5 était stable. Le résultat montre une expression de CRMP5 dans toutes les lignées testées (Figure 22 D) indiquant une perte de la répression de l'expression de la protéine même en conditions de sélection avec la puromycine (antibiotique de sélection).

Les lignées shRNA déficientes pour CRMP5 générées présentent un temps de doublement double de la lignée GL15, et une réduction de 30% de la prolifération. En présence de l'inhibiteur de la voie Notch, les GL15 présentent une inhibition de 45% avec extinction de l'expression de la protéine Notch clivée, confirmant l'inhibition de la voie Notch. Par contre il n'a pas été possible d'utiliser ces cellules pour injecter en orthotopique à la souris car le processus de sélection clonale a résulté en la modification des cellules avec réapparition au cours de la culture de l'expression de CRMP5

- c) CRMP5 et Notch présentent un même motif d'expression dans les Glioblastomes humains

Après avoir montré le rôle de CRMP5 dans l'expression des récepteurs Notch, l'activation de la voie de signalisation et la prolifération des glioblastomes. L'observation directe dans les tumeurs de patients de l'expression de CRMP5 et Notch 1 a été réalisée pour vérifier que ces deux protéines sont bien exprimées dans les mêmes zones d'un glioblastome. L'observation a été faite sur des coupes sériées, les deux anticorps spécifiques de CRMP5 et Notch 1 ne permettent pas de faire un co-marquage car ils sont produits chez la même espèce. L'utilisation d'autres anticorps ou le couplage de l'anti-CRMP5 a résulté en un fort marquage non spécifique vérifié sur des contrôles biologiques n'exprimant pas les protéines d'intérêt. Ce glioblastome exprime CRMP5 de manière hétérogène (Figures 23 A et C), les vaisseaux sont faiblement marqués. Notch 1 est exprimé par les vaisseaux (Figures 23 B et D) ce qui est cohérent avec son rôle dans la prolifération endothéliale et l'angiogenèse (Li, Sainson et al. 2007). Les cellules de la tumeur expriment Notch 1 avec une localisation nucléaire

(Figures 23 B et D) montrant l'activation de la voie de signalisation au cœur du glioblastome. Une zone exprime très faiblement CRMP5 (entourée en blanc, Figures 23 A et C), le marquage Notch 1 dans cette même zone sur une coupe adjacente (Figures 23 B et D), est également très faible. L'assemblage en palissades des noyaux bordant cette zone suggère un effet de nécrose des cellules, ce qui explique l'absence de marquage pour les deux protéines.

Ce résultat renforce l'idée d'une synergie fonctionnelle possible entre CRMP5 et Notch dans les glioblastomes puisque les cellules avec une voie Notch active expriment CRMP5.

- II- Premier Article : CRMP5 controls GBM proliferation and survival through a Notch dependent-signaling

CRMP5 controls glioblastoma cell proliferation and survival through Notch-dependent signaling

Aubin Moutal^{1,2}, Jérôme Honnorat^{1,4}, Patrick Massoma^{3,2}, Caroline Bertrand¹, Céline Mallevat¹, Chantal Watrin^{1,2}, Naura Chounlamountri¹, Marie-Eve Mayeur¹, Roger Besançon^{1,2}, Nicolas Naudet¹, François Ducray^{1,4}, David Meyronet^{1,5*}, Nicole Thomasset^{1*}.

Authors' Affiliations:

1 INSERM U1028 ; CNRS UM5292 ; Lyon Neuroscience Research Center, Neuro-oncology and Neuro-inflammation Team, Lyon, F-69000, France

2 Université Lyon 1, Lyon, F-69000, France

3 INSERM U1052 ; CNRS UM5286 ; Lyon Cancer Research Center, Lyon, F-69000, France

4 Hospices Civils de Lyon, Neuro-oncology Lyon, F-69003 France

5 Hospices Civils de Lyon, Centre de Pathologie et de Neuropathologie Est, Lyon, F-69003 France

* These authors contributed equally to this work

Running Title : CRMP5 promotes Notch dependent proliferation in glioblastoma

Keywords : Glioblastoma, CRMP5, Notch, Akt, Proliferation

Financial support

This work was supported by l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and Agence Nationale pour la Recherche, Emergence, 2007; a grant to NT from La Ligue Nationale Contre le Cancer, 2011; and a doctoral fellowship grant to AM (2010-2013) from La Ligue Nationale Contre le Cancer.

Corresponding author:

Nicole Thomasset. INSERM U1028, CNRS UMR5292, Lyon Neuroscience Research Center, Neuro-oncology and Neuro-inflammation Team, Faculty of Medicine Laennec, Street G.Paradin, Lyon, F-69372, Cedex08, France. E-mail: nicole.thomasset@inserm.fr; Fax: +33478778616; Phone: +33 6 84 33 97 14

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed

Word count (excluding references) : 50~~4~~[1206](#)

Total number of figures and tables : 6 figures, 4 supplementary figures and 1 supplementary table

Abstract

Collapsin response mediator protein 5 (CRMP5) belongs to a family of five cytosolic proteins that play a major role in nervous system development and cause neurodegenerative disorders as a result of cancer-induced autoimmune processes. CRMP5 protein expression is also a marker for high-grade lung neuroendocrine carcinomas and expressed in glioblastoma; however, its role in cancer cells remains unexplored. Here, we observed two different CRMP5 expression patterns in 183 human glioblastoma biopsies, and we show a direct relationship between CRMP5 protein expression and Notch receptor signaling pathways. We demonstrate that CRMP5 promotes Notch receptor expression *in vitro* and in human glioblastoma samples by hijacking Notch receptors from Itch-dependent lysosomal degradation. CRMP5 expression also positively modulates Akt activation and Hes1, two Notch signaling-dependent pathways, and controls glioblastoma cell proliferation through the modification of the G1/S cell cycle transition and abrogation of Cyclin D1 protein expression. We introduce CRMP5 protein as a novel, major mediator of Notch signaling activation through the control of Notch receptor degradation. Furthermore, CRMP5 protein provides a link between Notch and Akt activation contributing to a proliferative and aggressive signature in glioblastoma that correlates with patient survival.

Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most frequent and malignant glioma of the central nervous system(1) . Median survival time after diagnosis is still approximately 12 months. Biologically, GBM tumors are composed of heterogeneous cell populations including highly proliferative immature precursors and differentiated cells, which belong to different cell lineages(2,3). The heterogeneity of GBMs is considered to be a major cause of resistance to treatment and is recognized pathologically at the level of tumor cell proliferative activity(1). Notch signaling pathway activation has been described in GBM as a major pathway mediating proliferation and survival(4,5) and is involved in resistance mechanisms(6). Reinforcing the role of the Notch pathway in this tumor type, Notch1 protein expression is correlated with tumor progression and is an independent predictor of poor survival in glioma patients(7). Notch receptor activation is context-dependent and requires several cleavages, which subsequently lead to translocation of the cytoplasmic domain to the nucleus to promote Notch-targeted genes, such as the Hes/Hey bHLH transcription factors and Cyclin D1, a G1 to S cell cycle phase transition marker(8,9). Moreover, ectopic Notch activation affects other signaling pathways such as Ras and Akt, which play a major oncogenic role in GBM(10-12). However, many questions remain unanswered regarding how Notch receptor expression is regulated at various functional levels.

Collapsin response mediator proteins (CRMPs) (CRMP-1 to -5) are multifunctional proteins that are highly expressed in the developing brain and differentially expressed in several cancers(13,14). Expression profiling has identified CRMP1 and CRMP4 as suppressors of metastasis in lung adenocarcinoma(15) and prostate cancer(16), respectively, while CRMP2 is overexpressed in colorectal cancer(17), and CRMP4 promotes liver metastasis in pancreatic cancer(18). The most recently

identified CRMP, CRMP5(19-22), is widely expressed in the developing brain as well as in regions of neurogenesis in the adult brain(23). We previously showed that CRMP5 protein expression causes the development of paraneoplastic neurological syndromes consequent to lung cancer-induced autoimmune processes(22,24,25). Furthermore, we demonstrated that CRMP5 protein expression is a marker for high grade lung neuroendocrine carcinomas(26) and is expressed in glioblastoma(27). However, no specific role has yet been proposed for this protein in GBM, or, more largely, in the cancer process. Interestingly, in *Drosophila*, the CRMP homologue was recently described as promoting Notch signaling during the asymmetric division of sensory progenitors(28), which is a potential mechanism for glioma development(29) and suggests that CRMP5 and the Notch signaling pathway could be important in GBM.

Here, we demonstrate that CRMP5 controls proliferation by affecting cell cycle progression, and we identify an actively proliferating population in GBM tumors related to Notch. Loss and gain of CRMP5 expression in GBM cells demonstrated that CRMP5 protein controls post-tranlationally Notch and Akt activation. We uncovered an unexpected role for CRMP5 in facilitating Notch activation leading to GBM proliferation by preventing its lysosomal degradation. This study reveals a new physiopathological mechanism that regulate GBM proliferation and suggests the potential utility of CRMP5 protein as biomarker for use in the development of pre-therapeutic screening or follow-up programs.

Materials and Methods

Glioblastoma patient cohort

Glioblastoma samples were obtained from Hospices Civils de Lyon, Centre de Pathologie et Neuropathologie Est and Neurobiotec bank (Lyon, France). We studied 183 patients diagnosed with *de novo* GBM. All tumors biopsies were reviewed according to the 2007 WHO classification(1) and processed according to French ethical rules (i.e., informed consent was obtained from patients for all frozen samples used in this study).

Cell lines, Primary cultures, transfection and reagents

Human GBM-derived GL15(30) and A172 (ATCC® CRL-1620™) cell lines were maintained in DMEM-glutamax with 1 g.L⁻¹ glucose and 10% FBS. GBM-derived stem cells (GBM9) were kindly provided by Pr. Figarella-Branger(31). Human GBMs primary cultures were obtained from biopsies (Hospices Civils de Lyon) or xenografts(32) after dissociation, filtration through a 0.40-μm filter and culture in DMEM/F12 with 10% FBS. Transfections were performed using CRMP5 siRNA, Itch siRNA and pCEFL-GFP-CRMP5 with related negative controls. Efficiency was controlled for each experiment through western blot analyses. Protocols and reagents are detailed in supplementary methods.

For lysosomal degradation analysis, InSolution™ MG-132 (Calbiochem) and bafilomycin A1 (Tocris) inhibitors were added at final concentrations of 20 μM and 100 nM, respectively, 6 hours before harvesting; the control was treated with DMSO.

Cell proliferation assay

Cell proliferation was analyzed by adding Click-IT EdU (Invitrogen, A10044) (25 μg.mL⁻¹) 3 hours before fixation in culture medium following the manufacturer's

instructions, and DAPI staining was realized to count the nuclei. The analysis was performed by counting multiple representative fields to determine the proliferation index ratio (EdU/DAPI) in each sample..

Cell cycle analysis

GL15 cells were transfected with control or CRMP5 siRNA and harvested 72 hours after incubation, washed in PBS and fixed in cold 70% ethanol for 1 hour at 4°C. After washing with PBS, the cells were resuspended in 100 µg.mL⁻¹ RNase A (Sigma) for 30 min at 37°C, and 2.5 µg.mL⁻¹ propidium iodide was added before flow cytometric analysis on a FACS Canto II (BD Biosciences). The percentage of cells in G1, S, G2 and M phases was determined using ModFit software. A total of 20,000 cells were counted for each analysis..

RNA extraction and quantitative reverse transcription PCR

cDNA were generated after RNA extraction from cells (Tri Reagent (Invitrogen T9424) and Phase Lock Gel Heavy (5 Prime, 2302810)) using SCRIPT Reverse Transcriptase (Bioscience, PCR-505) according to the manufacturer's instructions.

Western blotting

The cells were harvested and lysed in 10mM TRIS-HCL buffer containing protease and phosphatase inhibitors. Protocol and antibodies used are described in Supplementary Methods

Hes1 promoter activation assay

The luciferase assay was performed by co-transfection of GL15 cells in 96-well plates with control siRNA, CRMP5 siRNA, control pGL4-18 plasmid or pGL4-18-hes1 plasmid, which express Firefly luciferase under the control of the hes1 promoter, and the pRRL plasmid, which expresses *Renilla* luciferase to normalize luciferase activity

and transfection efficiency. Protocols and reagents are provided in supplementary methods. The results are expressed in normalized firefly/Renilla ratios.

Immunostaining and microscopy analysis

All bright-field immunohistochemistry techniques were performed with CC1 and heating pretreatment using an UltraView detection kit with a Benchmark XT platform (Roche Diagnostics; Ventana Medical Systems) using anti CRMP5, Hes1 and Notch1 antibodies as detailed in supplemental methods. The indicated cells were fixed using ice-cold methanol. A primary polyclonal rabbit anti-CRMP5 antibody(22)was used. Human GBM samples were snap frozen shortly after resection, cut into 10- μ m thin slices and fixed with a 50% acetone-ethanol solution. Staining was performed using an anti-CRMP5 rabbit polyclonal antibody as previously described(22,26). A negative control was performed using the secondary antibody without the primary antibody.

The stained cells and tissues were analyzed on a confocal Zeiss 780 microscope at 63x magnification provided by the platform CeCILE (Lyon, France).

Statistical analyses

All quantitative data presented were analyzed as the mean \pm standard error. The level of significance was determined using Student's t-test, Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis test. For all in vitro assays, results from 3 independent experiments in triplicates were analyzed. Comparisons of categorical patient characteristics between subgroups were performed using the two-sided Fisher's exact test or chi-squared test. Survival curves were generated using the Kaplan-Meier method and compared with the log-rank test. Survival was defined as the time from first surgery corresponding to the date of the histological diagnosis to death or was censored at the date of last follow-up.

Multivariate Cox proportional hazards regression was used to adjust for additional covariates using the survival R package. All other statistical analyses were performed using JMP Pro 10.

Results

CRMP5 protein is expressed in human GBM, GBM cancer stem cells and established GBM-derived cell lines

We examined CRMP5 protein expression levels via western blot analyses in four surgical GBM tumor samples (tissues 3, 7, 8 and 9), five primary GBM cultures (cultures 2, 3, 4, 6 and 8), four GBM cell lines (GL15, A172, U-87 MG and SF767) and a GBM-derived stem cell-enriched culture (GBM9) (Fig. 1). CRMP5 appeared as a band with an apparent mass of 66 kDa in the majority of GBM tissues and cell lines. Smaller bands of 62 and 58 kDa were detected in certain GBM samples, as previously observed(26,27), during rat cerebellum development and in rat testis(22). Subcellular fractionation of GBM extracts and immunolocalization using a CRMP5 polyclonal antibody revealed the presence of cytoplasmic and nuclear forms of CRMP5 in GBM tumors, cell lines and stem cells (Fig. 1 and Supplementary Fig. S1).

CRMP5 protein expression in GBM tumors via immunohistochemical staining of paraffin sections was obtained from 183 GBM biopsies using a CRMP5 polyclonal antibody that was previously validated with lung tumor biopsies(26). We identified two different CRMP5 expression patterns : low CRMP5 expression (CRMP5_{LOW}: N=23, 12.6%) was characterized by weak, heterogeneously dispersed CRMP5 staining in 0 to 10% of cells, and high CRMP5 expression (CRMP5_{HIGH}: N=160, 87.4%) was characterized by highly diffuse cytoplasmic staining of CRMP5 in approximately 90% of tumor cells (Fig. 2A). In both CRMP5 expression patterns, a few cells with the highest levels of cytoplasmic expression also showed nuclear staining. The clinical characteristics of the patients did not differ significantly between the CRMP5_{LOW} and CRMP5_{HIGH} groups (Supplementary Table); however, the

CRMP5_{HIGH} expression pattern was associated with a lower median overall survival compared with the CRMP5_{LOW} expression pattern (7.14 versus 9.98 months; $p=0.0257$; Fig. 2B). Multivariate analysis using the Cox proportional hazards regression method including age, treatment regimen, performance status and CRMP5 status confirmed that CRMP5 expression was an independent factor influencing overall survival. Quantifying mitotic activity across the CRMP5_{LOW} and CRMP5_{HIGH} groups revealed a significantly lower mean mitotic index in the CRMP5_{LOW} group compared with the CRMP5_{HIGH} group (8.67 ± 1.19 versus 18.05 ± 2.43 cells per 10 high power-fields; $p < 0.0009$; Fig. 2C). These data confirm a proliferative advantage and an aggressive signature in GBM samples with homogenous CRMP5_{HIGH} versus CRMP5_{LOW} expression and suggest that CRMP5 expression could be a prognostic indicator in GBM.

CRMP5 promotes GBM cell proliferation through Cyclin D1 regulation of the G1/S transition

To study the potential role of CRMP5 in GBM proliferation, we further evaluated the proliferation of GBM primary cultures and cell lines in the absence of CRMP5 or when CRMP5 was overexpressed using the 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) incorporation assay. We tested the ability of a siRNA targeted against CRMP5 to downregulate protein expression in a GBM primary culture and in GL15 cells. Efficient silencing of CRMP5 demonstrated by western blot analysis was achieved (Fig. 3A and supplementary Fig. S2A). CRMP5 silencing led to a significantly lower mean proliferation index, which was decreased by 74.3% and 59.4% in the GBM primary culture and GL15 cell line, respectively, compared with the control (Fig. 3B and supplementary Fig. S2B). In addition, CRMP5 overexpression in GL15 cells transfected with the GFP-tagged CRMP5 construct increased the mean proliferation

index by more than 55% compared with cells transfected with an empty vector containing the GFP reporter (Fig. 3B). We also examined the effect of CRMP5 depletion on GL15 cell viability and apoptosis using a TUNEL assay; however, we did not observe a significant increase in DNA fragmentation, for up to 72 hours of culture (Supplementary Fig. S2C and S2D). Taken together, these results indicate that CRMP5 protein expression controls GBM cell proliferation without affecting apoptosis.

To further study the impact of CRMP5 on GBM proliferation, we analyzed cell cycle progression using flow cytometry following GL15 cell staining with propidium iodide (PI) in the absence or presence of CRMP5. We confirmed the effect of CRMP5 on cell proliferation through DNA histograms, which showed that transfection with CRMP5-siRNA led to a 53% decrease in the fraction of cells in S-phase and a 25% increase in the fraction of cells in G1 phase compared with control-siRNA transfection or non-transfected cells (NT), indicating a blockage from G1 to S phase (Fig. 3C). We finally examined the link between CRMP5 expression and Cyclin D1, a CDK regulator mediating the G1/S transition. Interestingly, Cyclin D1 protein expression was abolished in the GL15 cells transfected with CRMP5-siRNA compared with the cells transfected with control-siRNA (Fig. 3D). Our results reveal that CRMP5 is involved in enhancing GBM cell proliferation by controlling Cyclin D1 protein expression and the G1/S transition of the cell cycle.

CRMP5 is involved in Akt activation and Notch expression

Because Notch signaling pathway have a role in GBM cell proliferation and in the control of Cyclin D1 expression(10), we examined a possible connection between CRMP5 and the Notch pathway in GBM proliferation. Using calcium depletion by EDTA as previously documented(33), we observed efficient activation of Notch

signaling in GL15 cells, as evidenced by increased nuclear Notch localization. After treatment with DAPT, a γ -secretase inhibitor, Notch accumulated at the cell membrane (Supplementary Fig. S3). After CRMP5 silencing, GL15 cells lacked Notch1 and Notch2 expression, as detected with an antibody specific for membrane-tethered and cleaved Notch. Identical results were obtained using A172 cells transfected with CRMP5-siRNA (Fig. 4A). We also examined the role of CRMP5 in Akt regulation using GL15 cells transfected with CRMP5-siRNA or control-siRNA. After 3 days, western blot analysis showed that CRMP5-siRNA reduced active Akt (phospho-Ser 473), while the total Akt levels were not affected (Fig. 4A). In contrast, compared with expression of GFP alone, overexpression of GFP-tagged CRMP5 in GL15 cells induced strong Notch1 and Notch2 expression that was concomitant with overactivation of Akt phosphorylation (Fig. 4B). Our findings suggest that CRMP5 protein regulates the expression of Notch1 and Notch2 receptors and controls Akt activation as a Notch downstream target.

To further investigate the relationship between CRMP5 and Notch in GBM tumors, we examined, Notch1 expression in CRMP5_{LOW} and CRMP5_{HIGH} GBM biopsies. Anti-Notch1 immunohistochemical staining revealed two different Notch1 expression patterns following the two different CRMP5 expression patterns in GBM tumors (Fig. 4C). The percentage of GBM tumors expressing Notch1 was higher in the CRMP5_{HIGH} group than in the CRMP5_{LOW} group (94% (15/16) versus 46% (10/22); $p=0.0018$). Interestingly, all GBMs with nuclear Notch1 staining also displayed cytoplasmic staining; however, the opposite situation did not hold true. Therefore, we assessed the fraction of GBM tumors with Notch1 nuclear staining. The percentage of GBM tumors with Notch1 nuclear staining was also higher in the CRMP5_{HIGH} group than in the CRMP5_{LOW} group (88% (14/16) versus 23% (5/22); $p<0.0001$), as shown in Fig. 4C and D. Furthermore, the percentage of GBM tumors with Notch1

staining associated with mitotic figures was also significantly higher in the CRMP5_{HIGH} group than in the CRMP5_{LOW} group (75% (12/16) versus 9% (2/22); $p < 0.0001$). These data show that the proliferative advantage of CRMP5 expression in GBM is related to Notch1 activation.

CRMP5 positively modulates Notch signaling-dependent activation

The activated form of Notch translocates to the nucleus and regulates the transcriptional activity of target genes such as the hairy/enhancer of split (hes) genes(34). To study whether CRMP5 enhances hes1 gene transcription, we transiently transfected GL15 cells with a luciferase reporter construct driven by the hes1 promoter together with CRMP5-siRNA or control-siRNA. CRMP5-siRNA inhibited luciferase activity (normalized to *Renilla* luciferase activity) by 50% compared with control-siRNA (Fig. 5A). Next, we performed PCR analysis using RNA isolated from GL15 cells transfected with CRMP5-siRNA or control-siRNA. CRMP5-siRNA-transfected cells displayed 43% and 46% decreases in hes1 and hey1 mRNA levels, respectively (Fig. 5B). In addition, CRMP5 depletion in GL15 cells resulted in loss of Hes1 protein in both GL15 and A172 GBM cells (Fig. 5C). In contrast, CRMP5 overexpression increased Hes1 protein expression (Fig. 5D). These experiments indicate that CRMP5 can regulate the Notch downstream target, the hes1 promoter.

We next evaluated whether CRMP5_{HIGH} protein expression in GBM tumors was correlated with higher Hes1 protein expression levels. Hes1 protein staining revealed that Hes1 expression levels paralleled CRMP5 expression levels in GBM tumor cell nuclei (Fig. 5E). We then quantified the proportion of Hes1-stained nuclei in 3000 GBM tumor cells from the paraffin sections of CRMP5_{HIGH} and CRMP5_{LOW} GBM biopsies. Consistent with the above in vitro results (Fig. 5A, B, C and D), the

proportion of Hes1-stained cells in CRMP5_{LOW} GBM tumors was approximately two-fold lower than that in CRMP5_{HIGH} GBM tumors ($p < 0.0001$), as shown in Fig. 5F. These data confirm that Notch pathway activation in GBM tumors was correlated with CRMP5 levels.

CRMP5 regulates lysosomal degradation of Notch1 and 2

To further explore the loss of Notch receptor expression under CRMP5 depletion, we first performed qPCR analysis to assess notch1 and notch2 mRNA synthesis after CRMP5 silencing. We observed that CRMP5 depletion did not interfere with notch mRNA levels (Fig. 6A). Attenuation of Notch-targeted gene activation was correlated with the loss of Notch receptor expression, and previous studies have demonstrated that proteasome and Itch-dependent lysosomal degradation may account for Notch1 proteolysis(35). To explore the effect of CRMP5 on Notch protein proteolysis, we performed western blot analysis with extracts of GL15 cells transfected with CRMP5-siRNA or control-siRNA after 3 days in culture and a 6-hour treatment with proteasome (MG132) or lysosome (bafilomycin A1) inhibitor (Fig. 6B). The inhibitors had no effect on the cells transfected with control-siRNA, with no degradation of Notch receptors. When CRMP5 was depleted, application of the proteasome inhibitor MG132 did not affect Notch1 or Notch2 degradation. In contrast, treatment of CRMP5-depleted cells with lysosome inhibitor counteracted Notch1 and Notch2 receptor degradation. Thus, the accumulation of both Notch receptors under treatment with the lysosome inhibitor and after CRMP5 silencing clearly demonstrates that CRMP5 regulates Notch1 and Notch2 lysosomal degradation (Fig. 6B).

To confirm that the effects of CRMP5 on Akt activation and Notch-dependent proliferation were controlled by Itch-dependent Notch degradation, we bypassed the

Notch degradation mechanism via Itch knockdown using a specific siRNA targeted against the E3 Ubiquitin ligase, Itch. Co-transfection of CRMP5- and Itch-specific siRNAs was optimized to achieve efficient and reproducible protein repression in GL15 cells after 3 days in culture. While Itch repression had no effect on Akt activation, Notch receptors or Hes1 expression, co-repression of both CRMP5 and Itch rescued CRMP5-dependent Akt activation, CRMP5-dependent Notch receptor expression and Hes1 levels, as shown by western blot assays (Fig. 6C). Notch signaling activation in the absence of both Itch and CRMP5 indicated that Notch was no longer targeted for lysosomal degradation, and CRMP5 might protect Notch receptors from Itch-mediated lysosomal degradation. To functionally challenge Notch signaling pathway rescue, we tested whether CRMP5-dependent cell proliferation was restored after silencing of both CRMP5 and Itch. We analyzed GL15 cell proliferation after the silencing of CRMP5, Itch or both proteins using EdU incorporation. Itch knockdown had no effect on cell proliferation (Fig. 6D); however, knockdown of both CRMP5 and Itch rescued the CRMP5-dependent loss of proliferation previously observed (Fig. 3B; Fig. 6D) to basal levels (Fig. 6D), showing that loss of proliferation after CRMP5 silencing is entirely dependent on Itch-mediated lysosomal degradation of the Notch receptor. Accordingly, Notch receptor protein expression, which was rescued after both CRMP5 and Itch knockdown (Fig. 6C), led to the activation of a fully functional Notch signaling pathway, as evidenced by Hes1 expression and Akt activation (Fig. 6C), concomitant with full restoration of GBM cell proliferation (Fig. 6D). Therefore, CRMP5 protein controls GBM proliferation by hijacking Notch receptor degradation, leading to sustained Notch signaling pathway activation.

Discussion

Our studies on GBM cell lines and human GBM samples have characterized CRMP5 protein as a new player in Notch-mediated GBM proliferation and survival and have identified CRMP5 as a crucial molecule that protects Notch protein from lysosomal degradation, leading to sustained GBM cell proliferation.

CRMP5 is related to Notch proliferation in vitro and in human GBM tumors

Here, we demonstrated a significant correlation between the GBM mitotic index and CRMP5 expression, with CRMP5_{HIGH} GBM samples showing approximately 2-fold increases in the levels of mitosis ($p < 0.0009$) compared to CRMP5_{Low}. In addition, gain and loss of CRMP5 in in vitro assays demonstrated that CRMP5 positively modulates human GBM cell proliferation. Surprisingly, we previously reported a significant increase in neural cell proliferation in the brain neurogenesis zones of adult CRMP5-deficient mice(23). This discrepancy may indicate a different role for CRMP5 in cancer cells versus neural cells according to partners interactions. This hypothesis is supported by the increased proliferation index, observed in neuroblastoma cells after CRMP5 overexpression(27); conversely, progenitor proliferation in CRMP5-deficient mouse brain development may reveal a compensatory effect of another family member, CRMP2, because this isoform is expressed in the neurogenic zone of adult CRMP5-deficient mice and has previously been shown to support cell proliferation(36). Cell proliferation and cell cycle progression are regulated by cyclin proteins. In GBM, we demonstrated that CRMP5 depletion decreased the S-phase fraction by 53% and induced G0/G1 phase cell cycle arrest concomitant with a drastic reduction in the expression of Cyclin D1 protein, a regulator of the G1 to S-phase transition, and Notch protein expression. Other studies in human GBM have shown that Cyclin D1 controls proliferation(37)

and Notch activates proliferation through Cyclin D1(10). As we observed, Notch protein expression has been largely described in GBM cell lines and human surgical biopsy specimens(38). Our experiences leading to the gain or loss of CRMP5 expression in GBM cells demonstrated a direct effect of CRMP5 on Notch levels, which was confirmed in human GBM samples by a strict immunohistochemical correlation between Notch1, mitotic index and CRMP5 expression. These results suggest that CRMP5 and Notch expression can be used to identify an actively proliferative cell population with an aggressive signature in GBM patients. Previous studies have shown that loss of Notch1 and Notch2 positively predicts patient survival in subgroups of high grade glioma, and patients with high levels of Hes1 or Hey1, which are markers for canonical Notch pathway activation, have a significantly shorter overall survival as well(4,39,40). Furthermore, in GBM genomic analysis, CRMP5 overexpression emerged in a survival-associated cluster of genes whose overexpression resulted in shorter patient survival(41). Our results show that CRMP5_{HIGH} protein expression in GBM is related to a poorer prognosis.

CRMP5 modulates the Notch signaling pathway and Akt activation in GBM tumors

Notch is activated by canonical and non-canonical pathways, each of which is stimulated by different ligands. Some of these ligands, such as DNER, are involved in GBM progression(42). CRMP5 depletion did not alter DNER, DLL1 or Jagged 1 protein expression levels, indicating that Notch and CRMP5 regulate growth autonomously within the cells in which the Notch pathway is activated (Supplementary Fig. S4). In GBM, Notch signaling activation is often related to Akt activation(43). Akt is an important component of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) survival signaling in mammalian cell proliferation and survival(44). The dependence

of Notch signaling pathway activation on CRMP5 expression was evidenced by increased levels of Hes1 or Hey1, which are markers of the canonical Notch pathway, at the transcriptional, protein and activity levels. Accordingly, Hes1 protein expression was increased significantly (by 95%) in CRMP5_{HIGH} GBM specimens ($p < 0.0001$). Residual Hes1 expression in CRMP5_{LOW} GBM could be due to non-canonical activation of the hes1 promoter through other pathways such as the NF κ B pathway(45), which has been implicated in GBM pathogenesis. Taken together, these results show a correlation between CRMP5 and Notch1 expression in GBM and Notch1 pathway activation, as monitored by Hes1 nuclear staining, consequently leading to poorer patient survival. In addition, CRMP5 protein provides a possible mechanistic link between the intermingled pathways combining Notch and Akt activation to support GBM proliferation and survival.

Both CRMP5 and Itch control Notch lysosomal degradation

Many studies have suggested that both entry and trafficking of Notch within the endocytic pathway are important in the regulation of its activity(46). The dynamics of Notch trafficking after the early steps of Notch endocytosis require the E3 ubiquitin ligase AIP4/Itch allowing its final targeting to the lysosome for degradation(35,47). We demonstrated that Notch1 and Notch2 receptors are clearly targeted for lysosomal degradation in GBM cells in agreement with other studies on mammalian cells(48). We showed in GBM cells that Itch controls Notch receptors degradation while CRMP5 controls Notch receptors activation. Knockdown of both CRMP5 and Itch rescued the CRMP5-dependent loss of Notch receptor expression, Akt activation and Hes1 protein as well as GBM proliferation suggesting a new functional connection between Notch receptor activation and degradation through Itch and CRMP5. These data demonstrate that CRMP5 protein controls GBM proliferation by

hijacking Notch receptor degradation, leading to sustained Notch signaling, Akt activation and GBM proliferation.

In light of these data, we present CRMP5 as a novel major mediator of Notch signaling activation that functions by controlling Notch receptor lysosomal degradation. Furthermore, CRMP5 protein provides a link between Notch and Akt activation, contributing to a proliferative and aggressive signature in GBM and serving as an indicator of poor survival. We propose that CRMP5-dependent Notch receptor recovery could be a key oncogenic event in a large proportion of GBMs and that pharmacological inhibition of CRMP5 could represent a promising therapeutic approach..

Figure 1:

CRMP5 is expressed in the cytoplasm and nucleus of GBM cells. **(A):** CRMP5 expression was detected in GBM tumors and primary cultures by western blot assays using a specific polyclonal antibody; GAPDH was used as a loading control. **(B):** CRMP5 expression in GBM cell lines was detected by western blot assays; GL15, A172, U87 and SF767 are adherent cell lines, and GBM9 is a neurosphere (GBM stem cell model) cell line. GAPDH was used as a loading control. **(C):** Cytoplasmic and nuclear localization of CRMP5 in GL15 and A172 adherent cell lines and neurospheres; DAPI was used to stain the nucleus. **(D):** CRMP5 cytoplasmic and nuclear localization in human GBM; DAPI was used to stain the nucleus.

Figure 2:

CRMP5 expression in GBM is correlated with poor survival and increased proliferation. **(A)**: CRMP5 expression patterns in a series of 183 GBMs from HCL 2004-2008; CRMP5 was stained with a specific polyclonal antibody. The scale bar is 200 μ m. **(B)**: Kaplan-Meier survival analysis of GBM patients with regard to CRMP5 patterns; log-rank test, $p=0.0257$. **(C)**: Mitotic index quantification in GBMs and its correlation with CRMP5 expression. A total of 10 high power fields (HPFs) were used.

Figure 3:

GBM cell proliferation depends on CRMP5 expression for the G1/S cell cycle phase transition. **(A)**: CRMP5 silencing using siRNA in primary cultures or GL15 cells; actin was used as a loading control. **(B)**: Proliferation analysis by EdU incorporation in CRMP5-siRNA-transfected primary cultures and GL15 cells or GL15 cells overexpressing CRMP5; the results from 3 independent experiments were analyzed using the Kruskal-Wallis test. **(C)**: Cell cycle analysis using DNA content staining and flow cytometry in GL15 cells transfected with CRMP5-siRNA or control siRNA; (Modfit and a Kruskal-Wallis test). NT, non-treated cells. **(D)**: Loss of Cyclin D1 expression as detected by western blot assays in GL15 cells transfected with CRMP5 siRNA; actin shows equal loading for each condition.

Figure 4:

CRMP5 promotes Notch receptor expression *in vitro* and in human GBMs. **(A)**: Notch1 and Notch2 receptor protein expression analysis in GL15 and A172 GBM cells after CRMP5 blockage and Akt activation analysis in GL15 cells; actin was used as a loading control. **(B)**: Notch1 and Notch2 receptor expression and Akt activation analysis after CRMP5 overexpression; actin was used as a loading control. **(C)**: Notch1 staining in 16 CRMP5_{HIGH} and 22 CRMP5_{LOW} human GBM samples and Notch1 staining in mitotic figures; Positive Notch1 protein expression was determined according to the observation of cytoplasmic and/or nuclear staining in each sample. The staining was considered to be negative when no staining was observed in tumor cells. Proliferating endothelial cells were used as a positive internal control; the scale bars are 25 μ m; **(D)**: Qualitative quantification of Notch1 cytoplasmic, nuclear and mitotic figure staining in 16 CRMP5_{HIGH} and 22 CRMP5_{LOW} GBMs (chi-square test).

Figure 5:

CRMP5 controls Notch signaling pathway activation *in vitro* and in human GBMs.

(A): *hes1* promoter activity was monitored using a luciferase assay with normalization to *Renilla* luciferase (Mann-Whitney test). (B): mRNA expression of *hes1* and *hey1* after CRMP5 silencing in GL15 cells. The housekeeping gene was *ywhae* (Kruskall-Wallis test). (C): Loss of Hes1 expression was detected by western blotting in CRMP5-depleted GL15 and A172 GBM cells; actin was used as a loading control. (D): Hes1 expression in GL15 cells after CRMP5 overexpression was determined by western blotting using actin as a loading control. (E): Hes1 staining in 16 CRMP5_{HIGH} and 22 CRMP5_{LOW} human GBMs. The scale bar is 25 μ m. (F): Hes1 staining quantification was expressed as a percentage of positive nuclei in CRMP5_{HIGH} or CRMP5_{LOW} GBM (Student's t-test).

Figure 6:

CRMP5 expression controls Notch receptor degradation. **(A)**: mRNA analysis of Notch1 and Notch2 mRNA after CRMP5 blockage in GL15 GBM cells; ywhae was used as a housekeeping gene. The results from 3 independent experiments were analyzed in triplicate using the Kruskal-Wallis test. **(B)**: Notch receptor expression under proteasome or lysosome inhibition and CRMP5 silencing in GL15 cells; actin was used as a loading control. **(C)**: Notch receptor expression and Akt activation were analyzed by western blot after CRMP5 or/and Itch silencing; actin levels showed equal loading; **(D)**: Proliferation analysis of GL15 cells after CRMP5 or/and Itch knockdown monitored by EdU incorporation (Mann-Whitney test).

SUPPLEMENTARY DATA

Figure S1: Subcellular fractionation of the GL15 and A172 GBM cell lines and GBM xenografts. CRMP5 subcellular expression was analyzed by western blot, and the fraction purity was assessed using markers of each compartment: Calpain, cytosol; EGFR, membrane; histone H1, nucleus; vimentin, cytoskeleton.

Figure S2: CRMP5 depletion does not promote apoptosis. **A:** Effect of CRMP5 siRNA on targeted protein detection by western blot. The 2 siRNA CRMP5 used dramatically lowered detection of CRMP5 detection. Both gave equivalent results. For the sake of simplicity, only siRNA CRMP5-1 results are shown and labelled siRNA CRMP5. **B** Apoptosis is monitored in GL15 transfected with siRNA CRMP5 and control using caspase 3 antibody (1/400, BD Pharmingen, 559565) staining in siRNA control- or CRMP5-siRNA-transfected GL15 cells. 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) indicates proliferating cells in both conditions. **C:** TUNEL staining (marker of apoptosis) using TUNEL assay (Promega, G3250) in CRMP5-siRNA-transfected GL15 cells. **D:** TUNEL staining quantification in siRNA-transfected GL15 cells after 4 days. The total number of cells counted is indicated by DAPI quantification; TUNEL-stained cells were counted for each condition. The results are from 3 independent experiments.

Figure S3: Notch1 is activated in the GL15 GBM cell line. **A:** Notch staining in non-treated cells. **B:** Notch1 staining in EDTA-treated cells mimicking Notch activation and nuclear translocation. **C:** Notch1 staining in DMSO-treated cells. **D:** Notch1 staining after DAPT (inhibitor of Notch nuclear translocation) treatment.

Figure S4: CRMP5 does not modulate Notch ligand expression. Western blot analysis of three Notch ligands—Jagged 1, DLL1 and DNER—using specific antibodies after CRMP5 silencing; representative western blots of three independent experiments are shown.

Acknowledgments

We acknowledge Arlette Reynaud, Dominique Bouchany, Cassandra Nivou and Rachelle Plantier for technical assistance. We are grateful to Christelle Brou (Institut Pasteur, Paris) for providing the anti-DLL1 antibody. We thank CeCiLE (Lyon) for allowing the use of their platform facilities of confocal imaging and flow cytometry.

SUPPLEMENTARY METHODS

Western blot

The cells were harvested and lysed in 10 mM Tris-HCl, pH=8.0, 50 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, protease inhibitors (Complete protease inhibitor, EDTA-Free; Roche diagnostics, 04 693 132 001), 1 mM PMSF and Protease Inhibitor Cocktail Set III, EDTA-Free (Dilution 1/400, Calbiochem, 539134). The phosphatase inhibitors used were 2 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride, 2 mM sodium pyrophosphate and 2 mM sodium β -glycerophosphate. The following antibodies were used: CRMP5(22); Notch1 (1/1000, Abcam, ab52627); Notch2 (1/1000, Cell Signaling, 4530); Hes1 (1/500, Abcam, ab70576); CyclinD1 (1/1000, Cell Signaling, Danvers, 2978); Akt (1/1000, Cell Signaling, 2920); pAkt (1/1000, Cell Signaling, 4060); and Itch (1/2000, R&D, 611198). GAPDH (Millipore, MAB374) and actin (Sigma, A2066) were used as loading controls.

RNA extraction and quantitative reverse transcription PCR

RNA was extracted from cells using Tri Reagent (Invitrogen T9424) according to the Phase Lock Gel Heavy (5 Prime, 2302810) manufacturer's protocol. cDNA were generated using SCRIPT Reverse Transcriptase (Jena Bioscience, PCR-505) according to the manufacturer's instructions. qRT-PCR analysis was performed using Hot Pol Eva Green (Euromedex, 08-25-0001) on a Realplex2 (Eppendorf). The specific primers were as follows: dpysl5, 5'-CAGCATCTCGGAGGAGAACAT-3' and 5'-GTGGGTGCAGTCATCGTTCA-3'; notch1, 5'-CGGGGCTAACAAAGATATGC-3' and 5'-CACCTTGGCGGTCTCGTA-3'; notch2, 5'-TCCTTCATTTACACAGGGTTCA-

3' and 5'-GGAGGCGACCGAGAAGAT-3'; hes1, 5'-TGAGCACAGACCCAAGTGTG-3' and 5'-CCTCGGTATTAACGCCCTCG-3'; hey1, 5'-CGAAATCCCAAACCTCCGATA-3' and 5'-TGGATCACCTGAAAATGCTG-3'; and ywhae, 5'-ATAGGATGCGTTGGTGAAG-3' and 5'-TGAAAGGGGACTACACAGG-3'. ywhae was used as a housekeeping gene to normalize target mRNA expression between samples and experiments. The results were obtained from 3 independent experiments and analyzed in duplicate using the Kruskal-Wallis test.

Cell lines, transfection and reagents

The transfections were performed using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions. CRMP5 siRNA (5'-CCAACGCAGCTAAGCTTCTGAACCT-3') and negative Control Med GC (12935-300) were obtained from Invitrogen Life Technologies. Itch siRNA was from (Dharmacon (L-007196). Plasmid transfection was performed using pCEFL-GFP-CRMP5 or control plasmid(27) .

Immunohistochemistry and microscopy analysis

The following specific antibodies were standardized across our series of pre-analytic conditions using internal and external controls: the previously characterized anti-CRMP5 polyclonal rabbit antibody (Covalab, 1/100, CC1 std)(22); anti Hes1 (1/30, CC1 std, Cell Signaling 11988); and anti Notch1 (1/50, Abcam ab52627). Bright-field images were captured using Nikon D90 and DS-Ri1 cameras with a Leica DMLB microscope at 10x, 40x and 63x magnifications.

Luciferase reporter assay

To monitor *hes1* promoter activation, a plasmid containing the firefly luciferase coding sequence under the human *hes1* promoter was constructed. Human DNA was extracted from human PBMCs (EFS, Lyon) using the phenol-chloroform extraction method. The promoter sequence of the *hes1* gene from -600 bp to +100 bp from the transcription initiation codon was amplified through PCR using HD advantage polymerase (Clontech Laboratories, 639241) and the primers 5'-ACCTGAGCTCGCTAGTTTAGATGTGTCGGTAACTCACATTCTTAC-3' and 5'-TATCCTCGAGGCTAGGTGGCTACTTGGTGATCAGTAGCGCTGTTC-3' and subsequently recombined in pGL4-18 plasmid using the In-Fusion PCR Cloning Kit (Clontech, 638909). The generated plasmids were verified through sequencing. The luciferase assay was performed by co-transfection of GL15 cells in 96-well plates with control siRNA, CRMP5 siRNA, control pGL4-18 plasmid or pGL4-18-*hes1* plasmid, which express Firefly luciferase under the control of the *hes1* promoter, and the pRRL plasmid, which expresses *Renilla* luciferase to normalize luciferase activity and transfection efficiency. The transfections were performed using Lipofectamine 2000; siRNA transfection was verified as 100% using BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo (Invitrogen, 2013). Luciferase activity was analyzed 72 hours after transfection using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega).

Supplementary Table : Clinicopathological characteristics of patients according to CRMP5 status

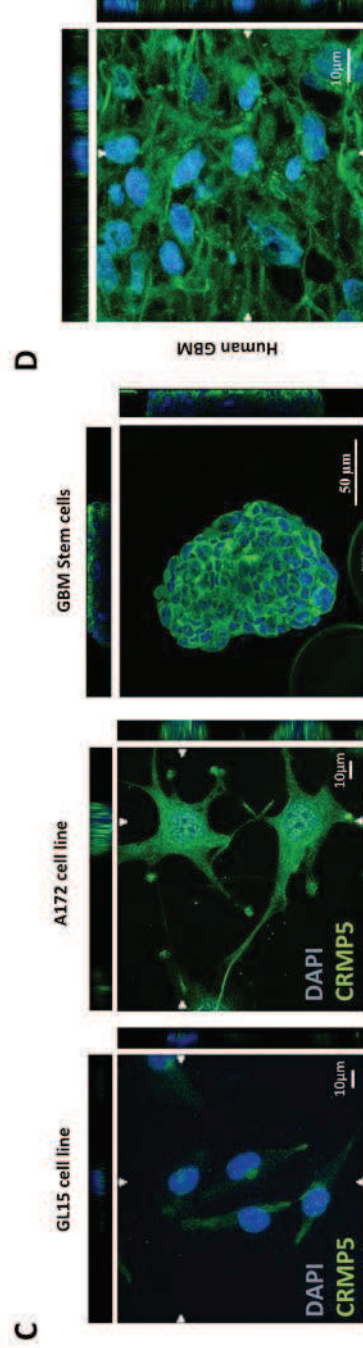
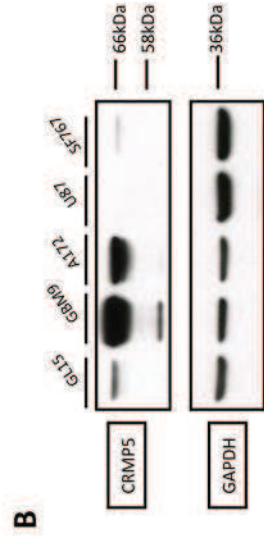
	CRMP5 low	CRMP5 high	p-value	Test
Number of Patients (%)	23 (12.6%)	160 (87.4%)		
Age (years)				
Median	61	67	0.2445	
Range	28-80	33-83		Student's t-test
Number of patients >70 years	8 (34%)	62 (38.8%)	0.7161	
Number of patients >75 years	6 (26.1%)	29 (18.1%)	0.3667	
Gender				
Male (N=118)	18 (78.3%)	100 (62.5%)		
Female (N=65)	5 (21.7%)	60 (37.5%)	0.1669	Fisher's exact test
Ratio (M/F=1.81)	3.6	1.7		
Type of surgery				
Stereotactic biopsy (N=119)	13 (56.5%)	106 (66.3%)		
Partial or total surgical removal (N=64)	10 (43.5%)	54 (33.8%)	0.3603	Chi-square test
Post-surgery Karnofsky Performance Index				
Mean	78 %	73 %	0.2218	Student's t-test
Range	30 - 100	30 - 100		
Initial treatment				
Concomitant RTCT (Stupp regimen) (N=55)	5 (21.7%)	50 (31.3%)		
Non-concomitant RTCT (N=27)	6 (26.1%)	21 (13.1%)	0.2088	Chi-square test
RT only or CT only (N=49)	8 (34.8%)	41 (25.6%)		
Palliative (N=51)	4 (17.4%)	47 (29.4%)		
Information not available (N=1)	0	1		

Bibliographie

1. Louis DN, Agency for Research on Cancer I, Ohgaki H, Cavenee WK, Wiestler OD. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: WHO ... - Page 260. 2007.
2. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SG, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, et al. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013 ed. 2013;110:4009–14.
3. Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2006 ed. 2006;6:425–36.
4. Purow BW, Haque RM, Noel MW, Su Q, Burdick MJ, Lee J, et al. Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res*. 2005 ed. 2005;65:2353–63.
5. Stockhausen M-T, Kristoffersen K, Poulsen HS. The functional role of Notch signaling in human gliomas. *Neuro-oncology*. 2010 ed. 2010;12:199–211.
6. Wang J, Wakeman TP, Lathia JD, Hjelmeland AB, Wang XF, White RR, et al. Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells*. 2009 ed. 2010;28:17–28.
7. Li J, Cui Y, Gao G, Zhao Z, Zhang H, Wang X. Notch1 is an independent prognostic factor for patients with glioma. *J Surg Oncol*. 2011 ed. 2011;103:813–7.
8. Krejci A, Bray S. Notch activation stimulates transient and selective binding of Su(H)/CSL to target enhancers. *Genes Dev*. 2007 ed. 2007;21:1322–7.
9. Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R. Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature*. 1998 ed. 1998;393:382–6.
10. Fan X, Khaki L, Zhu TS, Soules ME, Talsma CE, Gul N, et al. NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells*. 2009 ed. 2010;28:5–16.
11. Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet*. 2000 ed. 2000;25:55–7.
12. Zhao N, Guo Y, Zhang M, Lin L, Zheng Z. Akt-mTOR signaling is involved in Notch-1-mediated glioma cell survival and proliferation. *Oncol Rep*. 2010 ed. 2010;23:1443–7.
13. Charrier E, Reibel S, Rogemond V, Aguera M, Thomasset N, Honnorat J. Collapsin response mediator proteins (CRMPs): involvement in nervous system development and adult neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol*. 2003rd ed. 2003;28:51–64.
14. Wang L, Strittmatter S. A family of rat CRMP genes is differentially expressed in the nervous system. *J Neurosci*. 1996;16:6197–207.
15. Shih J, Lee Y, Yang S, Hong T, Huang C, Yang P. Collapsin response mediator protein-1: a novel invasion-suppressor gene. *Clin Exp Metastasis*. 2003;20:69–76.
16. Gao X, Pang J, Li LY, Liu WP, Di JM, Sun QP, et al. Expression profiling identifies new function of collapsin response mediator protein 4 as a metastasis-suppressor in prostate cancer. *Oncogene*. 2010 ed. 2010;29:4555–66.
17. Wu C-C, Chen H-C, Chen S-J, Liu H-P, Hsieh Y-Y, Yu C-J, et al. Identification of collapsin response mediator protein-2 as a potential marker of colorectal carcinoma by comparative analysis of cancer cell secretomes. *Proteomics [Internet]*. 2008 ed. 2008;8:316–32. Available from: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/117889499/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>

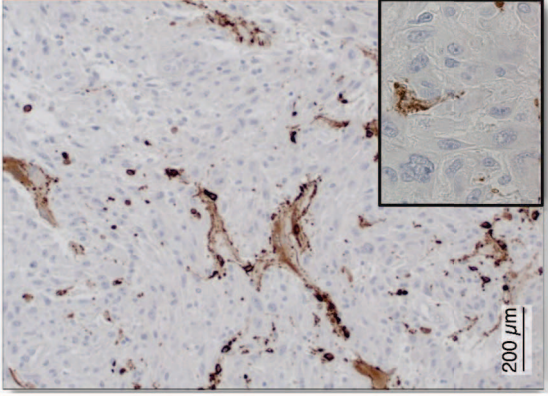
18. Hiroshima Y, Nakamura F, Miyamoto H, Mori R, Taniguchi K, Matsuyama R, et al. Collapsin response mediator protein 4 expression is associated with liver metastasis and poor survival in pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol*. 2012 ed. 2013;20:369–78.
19. Fukada M, Watakabe I, Yuasa-Kawada J, Kawachi H, Kuroiwa A, Matsuda Y, et al. Molecular characterization of CRMP5, a novel member of the collapsin response mediator protein family. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 ed. 2000;275:37957–65. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/content/full/275/48/37957>
20. Horiuchi M, Far el O, Betz H. Ulip6, a novel unc-33 and dihydropyrimidinase related protein highly expressed in developing rat brain. *FEBS Lett*. 2000;480:283–6.
21. Inatome R, Tsujimura T, Hitomi T, Mitsui N, Hermann P, Kuroda S, et al. Identification of CRAM, a novel unc-33 gene family protein that associates with CRMP3 and protein-tyrosine kinase(s) in the developing rat brain. *J Biol Chem*. 2000 ed. 2000;275:27291–302.
22. Ricard D, Rogemond V, Charrier E, Aguera M, Bagnard D, Belin MF, et al. Isolation and expression pattern of human Unc-33-like phosphoprotein 6/collapsin response mediator protein 5 (Ulip6/CRMP5): coexistence with Ulip2/CRMP2 in Sema3a- sensitive oligodendrocytes. *J Neurosci*. 2001st ed. 2001;21:7203–14.
23. Veyrac A, Reibel S, Sacquet J, Mutin M, Camdessanché J-P, Kolattukudy P, et al. CRMP5 Regulates Generation and Survival of Newborn Neurons in Olfactory and Hippocampal Neurogenic Areas of the Adult Mouse Brain. *PLoS ONE*. 2011 ed. 2011;6:e23721.
24. Honnorat J, Cartalat-Carel S, Ricard D, Camdessanche JP, Carpentier AF, Rogemond V, et al. Onco-neural antibodies and tumour type determine survival and neurological symptoms in paraneoplastic neurological syndromes with Hu or CV2/CRMP5 antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 2008 ed. 2009;80:412–6.
25. Yu Z, Kryzer TJ, Griesmann GE, Kim K, Benarroch EE, Lennon VA. CRMP-5 neuronal autoantibody: marker of lung cancer and thymoma-related autoimmunity. *Ann Neurol* [Internet]. 2001st ed. 2001;49:146–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11220734>
26. Meyronet D, Massoma P, Thivolet F, Chalabreysse L, Rogemond V, Schlama A, et al. Extensive expression of collapsin response mediator protein 5 (CRMP5) is a specific marker of high-grade lung neuroendocrine carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2008 ed. 2008;32:1699–708.
27. Brot S, Malleval C, Benetollo C, Auger C, Meyronet D, Rogemond V, et al. Identification of a new CRMP5 isoform present in the nucleus of cancer cells and enhancing their proliferation. *European Journal of Cancer*. 2013 ed. 2013;319:588–99.
28. Jauffred B, Llense F, Sommer B, Wang Z, Martin C, Bellaiche Y. Regulation of centrosome movements by numb and the collapsin response mediator protein during *Drosophila* sensory progenitor asymmetric division. *Development*. 2013 ed. 2013;140:2657–68.
29. Berger F, Gay E, Pelletier L, Tropel P, Wion D. Development of gliomas: potential role of asymmetrical cell division of neural stem cells. *Lancet Oncol*. 2004 ed. 2004;5:511–4.
30. Bocchini V, Casalone R, Collini P, Rebel G, Curto Lo F. Changes in glial fibrillary acidic protein and karyotype during culturing of two cell lines established from human glioblastoma multiforme. *Cell Tissue Res*. 1991st ed. 1991;265:73–81.
31. Tchoghandjian A, Baeza N, Colin C, Cayre M, Metellus P, Beclin C, et al. A2B5 cells from human glioblastoma have cancer stem cell properties. *Brain Pathol*. 2009 ed. 2010;20:211–21.
32. Taillandier L, Antunes L, Angioi-Duprez KS. Models for neuro-oncological preclinical studies: solid orthotopic and heterotopic grafts of human gliomas into nude mice. *Journal of Neuroscience Methods*. 2003rd ed. 2003;125:147–57.

33. Rand MD, Grimm LM, Artavanis-Tsakonas S, Patriub V, Blacklow SC, Sklar J, et al. Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors. *Mol Cell Biol*. 2000 ed. 2000;20:1825–35.
34. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999 ed. 1999;284:770–6.
35. Chastagner P, Israel A, Brou C. AIP4/Itch regulates Notch receptor degradation in the absence of ligand. *PLoS ONE*. 2008 ed. 2008;3:e2735.
36. Tahimic CGT, Tomimatsu N, Nishigaki R, Fukuhara A, Toda T, Kaibuchi K, et al. Evidence for a role of Collapsin response mediator protein-2 in signaling pathways that regulate the proliferation of non-neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 ed. 2006;340:1244–50.
37. Wang J, Wang Q, Cui Y, Liu ZY, Zhao W, Wang CL, et al. Knockdown of cyclin D1 inhibits proliferation, induces apoptosis, and attenuates the invasive capacity of human glioblastoma cells. *J Neurooncol*. 2011 ed. 2012;106:473–84.
38. Kanamori M, Kawaguchi T, Nigro JM, Feuerstein BG, Berger MS, Miele L, et al. Contribution of Notch signaling activation to human glioblastoma multiforme. *J Neurosurg*. 2007 ed. 2007;106:417–27.
39. Boulay JL, Miserez AR, Zweifel C, Sivasankaran B, Kana V, Ghaffari A, et al. Loss of NOTCH2 positively predicts survival in subgroups of human glial brain tumors. *PLoS ONE*. 2007 ed. 2007;2:e576.
40. Gaetani P, Hulleman E, Levi D, Quarto M, Scorsetti M, Helins K, et al. Expression of the transcription factor HEY1 in glioblastoma: a preliminary clinical study. *Tumori*. 2010 ed. 2010;96:97–102.
41. Liang Y, Diehn M, Watson N, Bollen AW, Aldape KD, Nicholas MK, et al. Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 2005 ed. 2005;102:5814–9. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/102/16/5814>
42. Sun P, Xia S, Lal B, Eberhart CG, Quinones-Hinojosa A, Maciaczyk J, et al. DNER, an epigenetically modulated gene, regulates glioblastoma-derived neurosphere cell differentiation and tumor propagation. *Stem Cells*. 2009 ed. 2009;27:1473–86.
43. Xu P, Qiu M, Zhang Z, Kang C, Jiang R, Jia Z, et al. The oncogenic roles of Notch1 in astrocytic gliomas in vitro and in vivo. *J Neurooncol*. 2009 ed. 2010;97:41–51.
44. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002nd ed. 2002;2:489–501.
45. Aguilera C, Hoya-Arias R, Haegeman G, Espinosa L, Bigas A. Recruitment of IkappaBalpha to the hes1 promoter is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 ed. 2004;101:16537–42.
46. Yamamoto S, Charng W-L, Bellen HJ. Endocytosis and intracellular trafficking of Notch and its ligands. *Curr Top Dev Biol*. 2010;92:165–200.
47. Qiu L, Joazeiro C, Fang N, Wang HY, Elly C, Altman Y, et al. Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hect-type E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*. 2000 ed. 2000;275:35734–7.
48. Puca L, Chastagner P, Meas-Yedid V, Israël A, Brou C. A-arrestin 1 (ARRDC1) and β -arrestins cooperate to mediate Notch degradation in mammals. *J Cell Sci*. 2013;126:4457–68.

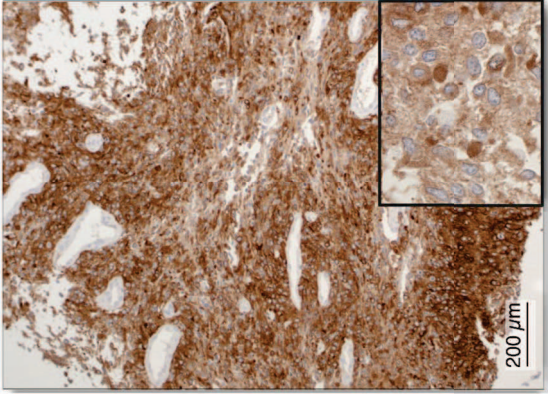


A

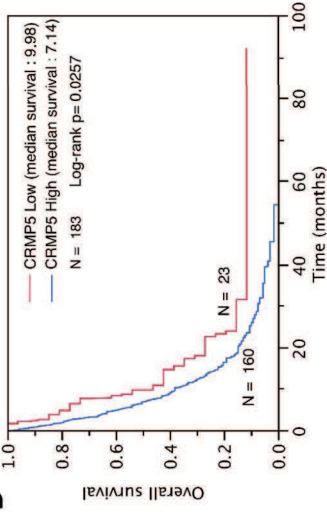
Low CRMP5 expression pattern (N=23)



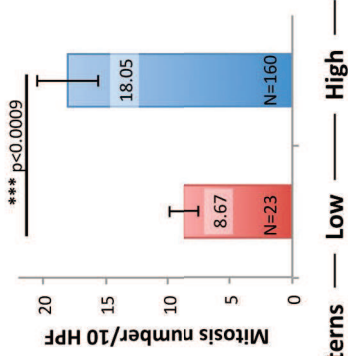
High CRMP5 expression pattern (N=160)

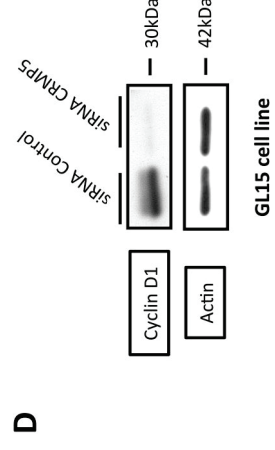
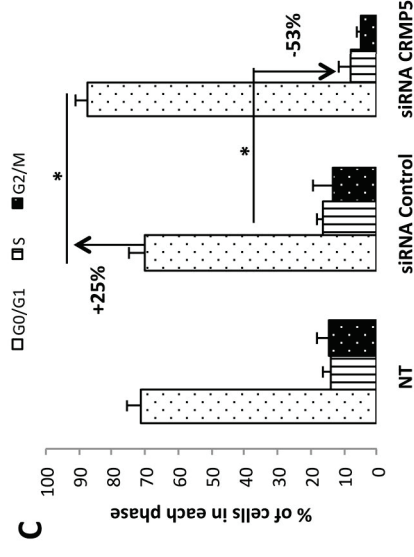
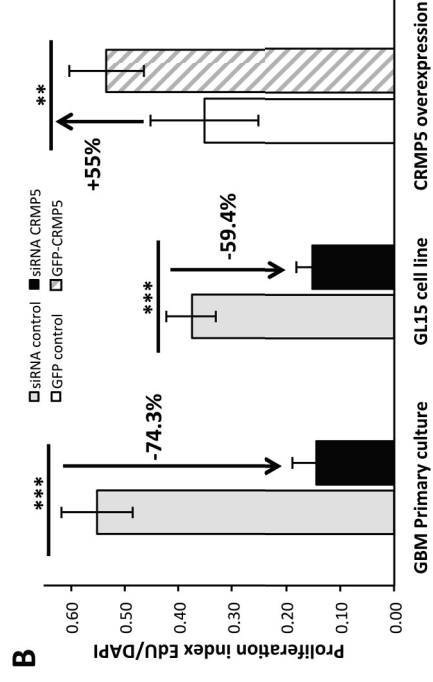
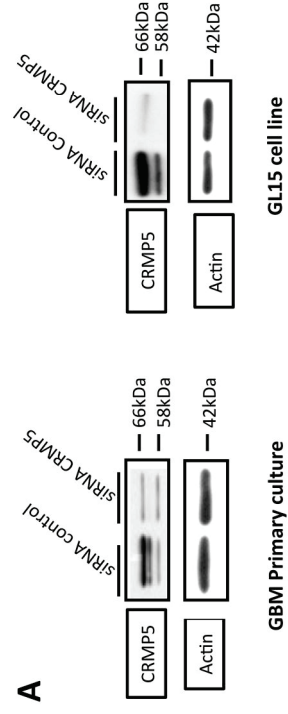


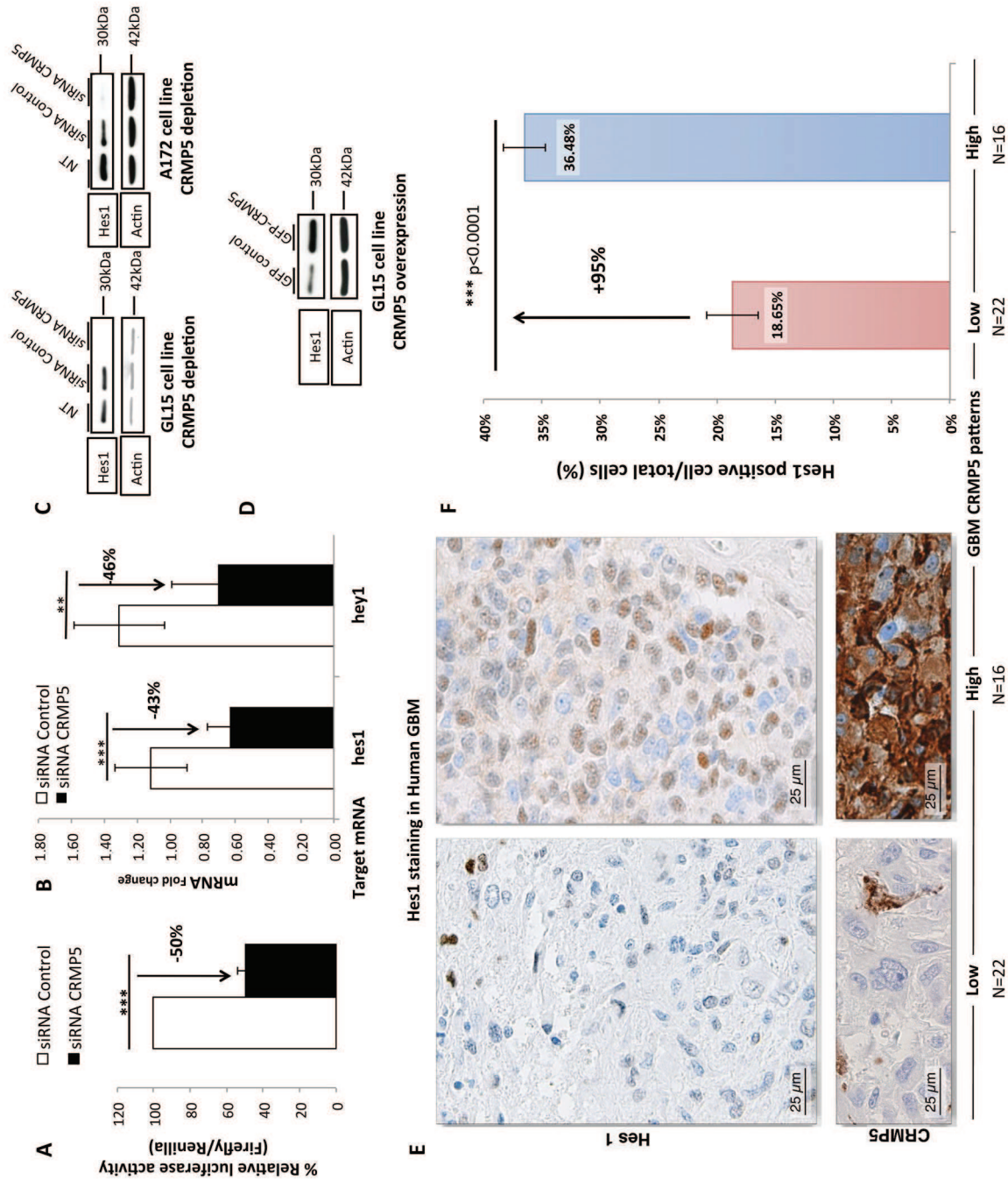
B

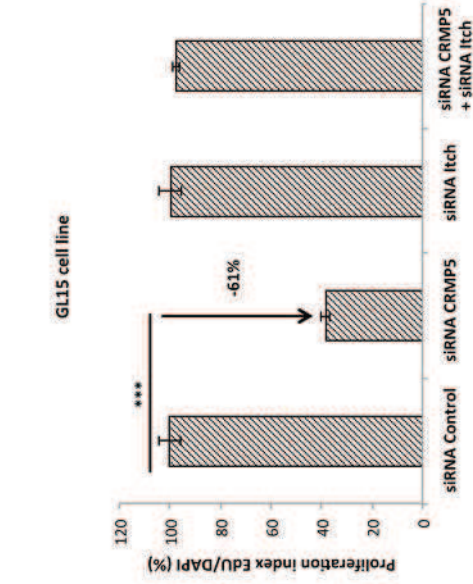
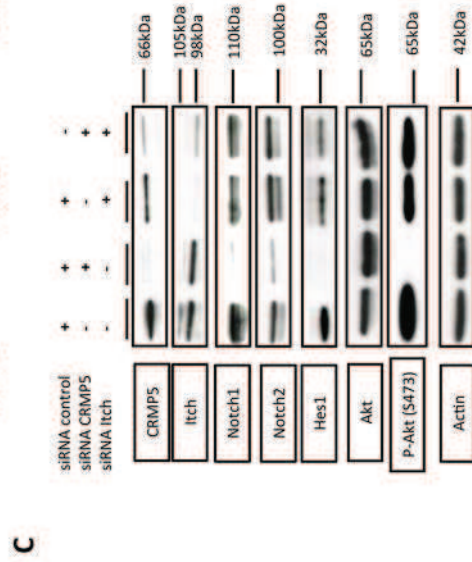
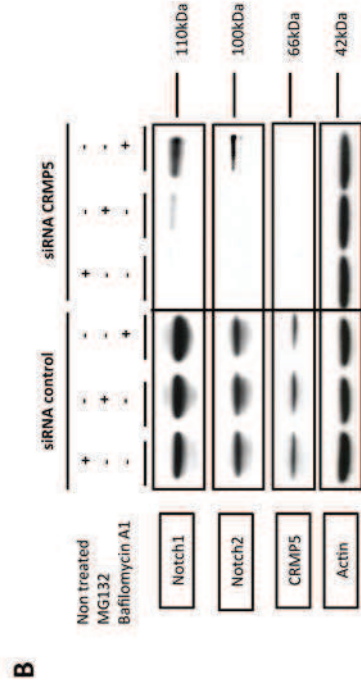
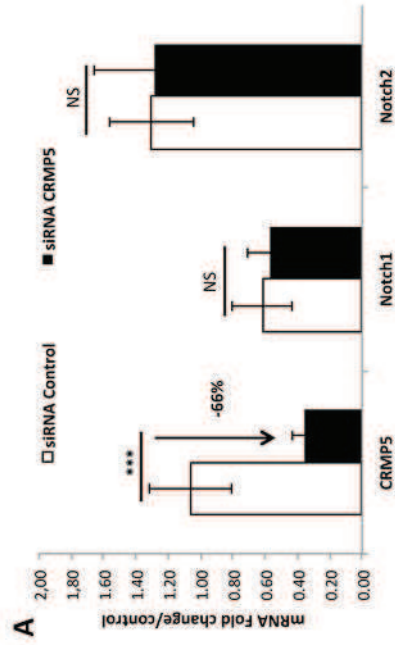


C









Akt downstream targets activation under CRMP5 loss of expression in glioblastoma

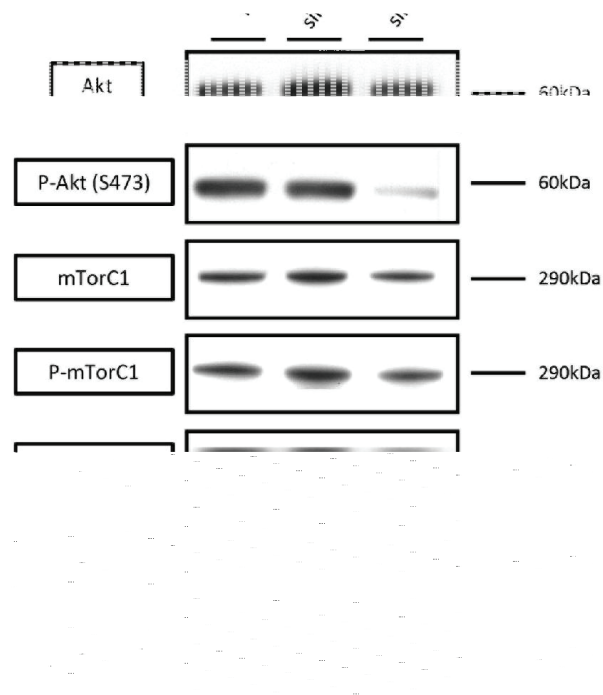


Figure 24 : Western Blot des cellules GL15 transfectées par un siRNA pour réprimer l'expression de CRMP5. Les cellules ont été lysées en conditions d'inhibition des phosphatases intracellulaires. L'activation des protéines de la voie Akt a été analysée par l'utilisation d'anticorps spécifiques en conditions dénaturantes et réductrices sur un gel de polyacrylamides en gradient 4%-12%. L'actine est utilisée comme témoin de la charge des puits.

Résultats complémentaires à l'article

CRMP5 contrôle l'activation d'Akt de manière indépendante de mTor

L'activation d'Akt est une voie importante de prolifération dans les glioblastomes et a été montrée dépendante de l'activation de la voie de signalisation Notch. Akt a de nombreuses cibles dans les cancers et notamment la protéine mTor (mammalian Target of rapamycin) qui elle-même active la protéine p70S6 kinase (p70S6K) dans le glioblastome (Compostella, Tosoni et al. 2007; Lino and Merlo 2011). Ces protéines sont impliquées dans la prolifération et la résistance aux traitements. L'activation d'Akt par phosphorylation a été montrée dépendante de l'expression de CRMP5 dans le glioblastome (Figure 24). Nous avons donc vérifié l'activation des cibles d'Akt dans notre modèle. Par western Blot l'expression de mTor et p70S6K a été détectée (Figure 24) et n'est pas altérée lors de l'inhibition de l'expression de CRMP5 (siRNA). La perte de phosphorylation d'Akt (Ser473) n'a donc pas résulté en la perte de phosphorylation des protéines mTor et sa cible p70S6K.

These results show that CRMP5 controls Akt activation but not the activation of its downstream targets mTor and p70S6K. Both protein are activated in an independent manner of Notch in our model.

Numb is expressed in glioblastoma

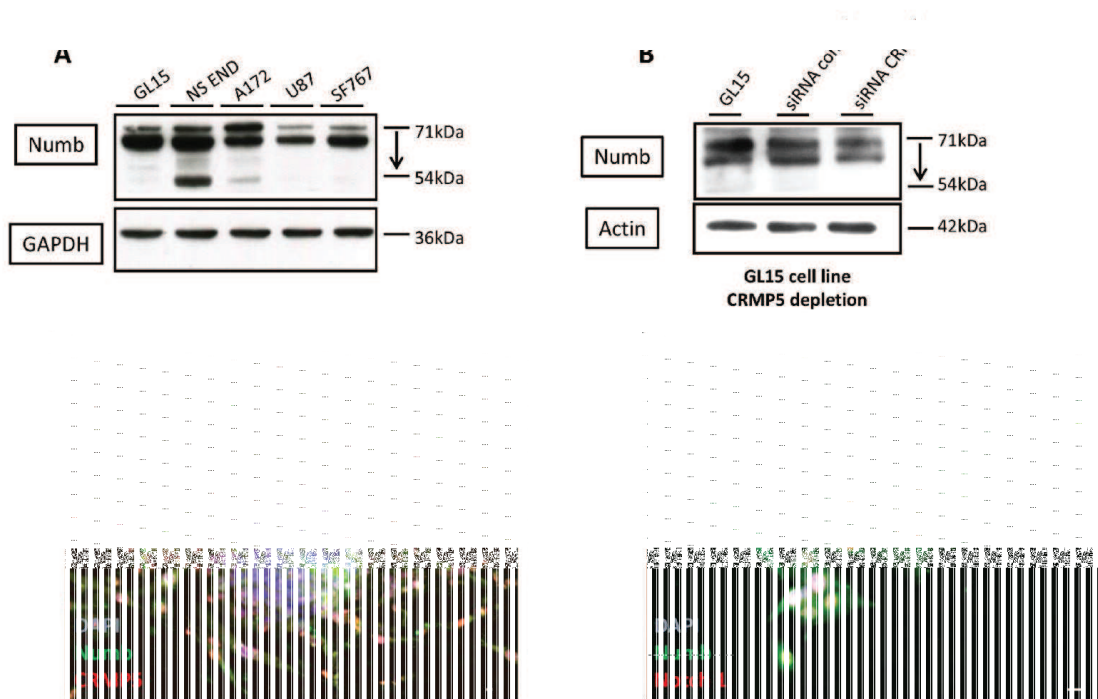


Figure 25 : **A :** Analyse par western blot de l'expression de Numb dans des lignées de glioblastome humain (GL15, A172, U87, SF767) et une lignée de neurosphères (NS END), la GAPDH est détectée comme témoin de charge; **B :** Analyse en western blot de l'expression de Numb sur des cellules GL15 contrôles (GL15, siRNA control) ou déplétées en CRMP5 (siRNA CRMP5), l'Actine est utilisée comme témoin de charge; **C :** Co-expression de CRMP5 (rouge) et Numb (vert) dans des neurosphères isolées à partir de xénogreffe de glioblastome, la DAPI marque les noyaux, la barre d'échelle représente 10μm réels ; **D :** co-expression de Notch 1 (rouge) et Numb dans des cellules issues de neurosphères, le DAPI marque les noyaux, la barre d'échelle représente 10μm réels.

III- Second article: CRMP5 protects Notch against Numb-mediated degradation thereby promoting Glioblastoma proliferation

a) Numb est exprimée dans les glioblastomes

La protéine Numb est un inhibiteur de la voie Notch. Dans le but d'étudier le mécanisme d'action de CRMP5 en relation avec l'activation de la voie Notch, la première étape a été de vérifier l'expression de la protéine dans les lignées cellulaires issues de glioblastome. L'expression de Numb, est détectée par western blot (Figure 25 A). La protéine est exprimée dans toutes les lignées cellulaires testées et dans la lignée de cellules souches de glioblastome (END=neurosphères) (Figure 6 A). Plusieurs isoformes de Numb sont détectées de 71kDa (Numb 1) à 54kDa (Numb 6) (Figure 25 A). La bande la plus intense correspond à l'isoforme Numb 4, majoritaire dans les glioblastomes (Jiang, Xing et al. 2012). Avant d'aborder la relation entre CRMP5 et Numb, nous avons vérifié si l'expression de la protéine Numb dépendait de celle de CRMP5. Dans la lignée GL15, l'extinction de CRMP5 par des siRNA spécifiques ne modifie pas l'expression de Numb (Figure 25 B) tant en terme de quantité qu'en terme d'isoformes exprimées puisque les deux bandes sont détectées dans tous les échantillons correspondant à Numb 2 et Numb 4 (Figure 25 B).

La voie de signalisation Notch est importante dans le maintien et la prolifération des cellules, et l'inhibition de cette voie a été efficace pour prévenir toute formation de Neurosphères en culture (REF). Nous savons que CRMP5 est fortement exprimée dans cellules souches de glioblastome cultivées en Neurosphères. Comme la voie Notch est activée, Numb l'inhibiteur physiologique de Notch pourrait ne pas être exprimé. Par immunocytofluorescence, la co-expression de CRMP5 et Numb dans les neurosphères a été analysée (Figure 6 C). CRMP5 est exprimée dans les neurosphères de glioblastome avec une localisation nucléaire et cytoplasmique (Figure 6 C). Dans ce modèle la protéine Numb est également exprimée. La détection de Notch et de Numb dans les neurosphères montre un co-marquage des deux protéines avec une localisation nucléaire de Notch 1 montrant l'activation de la voie de signalisation (Figure 25 D).

These results show, in agreement with the littérature, Numb ubiquitary expression and particularly of the isoform 4 in glioblastoma, GL15 cell line and neurospheres. Numb expression is detected in CRMP5 expressing cells with an active Notch signaling pathway as showed by notch nuclear staining.

CRMP5 abolishes Notch receptors lysosomal degradation

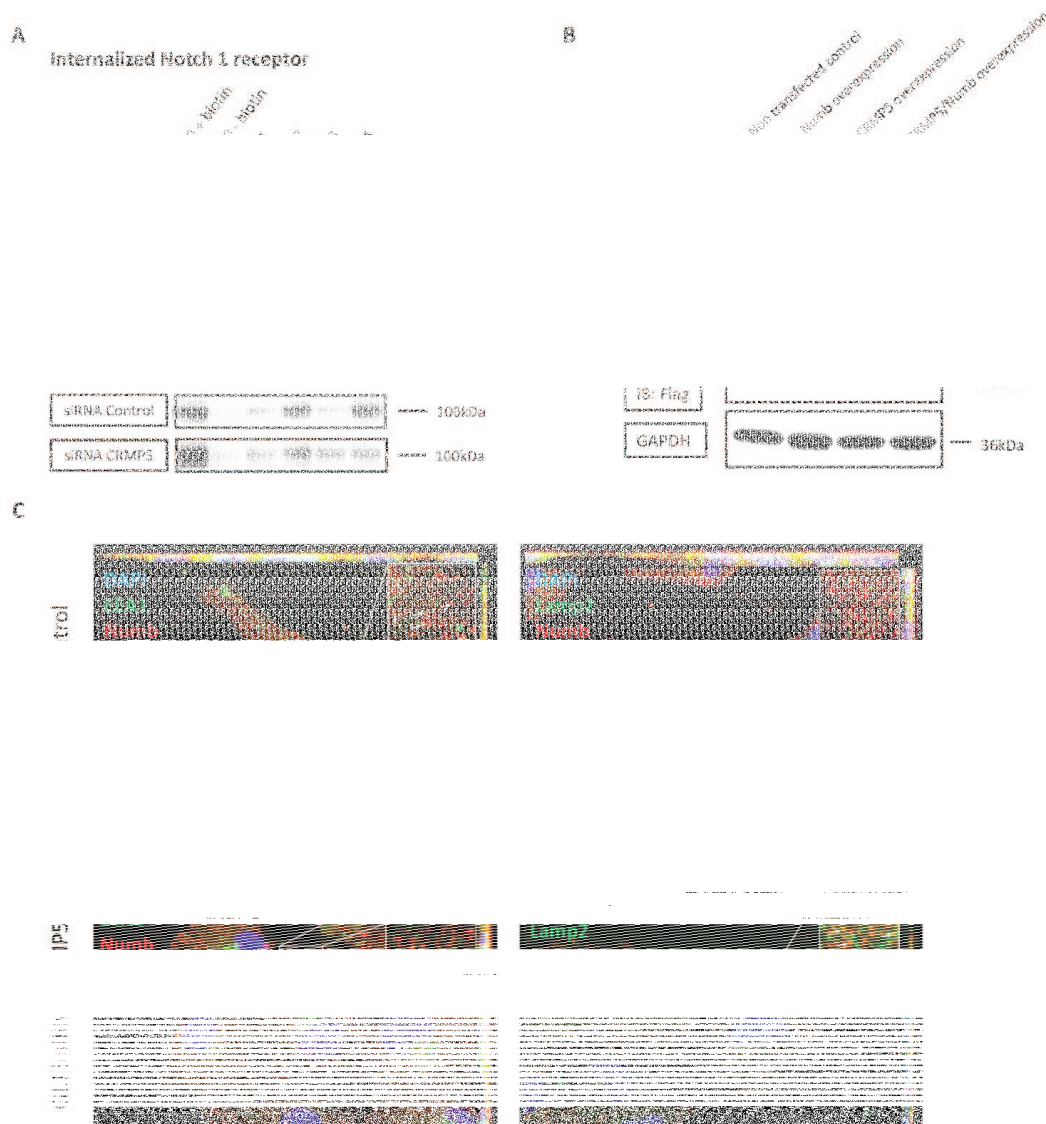


Figure 26 : A : Cinétique d'internalisation des récepteurs Notch 1 et Notch 2 sur des cellules GL15 en fonction de l'expression de CRMP5 (siRNA CRMP5), t0+biotin montre l'efficacité de la biotinylation de surface, t0-biotin montre l'efficacité de l'étape d'élimination de la biotine à la surface des cellules ; **B :** Analyse en western blot de l'expression des récepteurs Notch 1 et Notch 2 en fonction de l'expression de CRMP5 et Numb par transfection de cellules HEK, la GAPDH est utilisée comme témoin de charge ; **C :** Co-localisation de Numb dans les endosomes précoces (EEA1) ou les lysosomes (Lamp2) en fonction de l'expression de CRMP5 (siRNA CRMP5) dans des cellules GL15, les flèches montrent la colocalisation de Numb avec les marqueurs d'organites, le DAPI marque les noyaux, les barres d'échelle représentent 10µm réels.

b) CRMP5 abolit la dégradation lysosomale de Notch induite par Numb

Pour vérifier de manière directe l'action de CRMP5 sur les fonctions de Numb, l'internalisation du récepteur Notch en absence de CRMP5 a été analysée par biotinylation de surface (Figure 26 A). L'expression de CRMP5 a été bloquée (siRNA) dans les cellules GL15. Les protéines membranaires ont été marquées par biotinylation puis les cellules ont été incubées à 21°C pendant 1 heure à 4 heures ce qui permet d'observer très lentement le trafic de récepteurs. Pour chaque temps, la biotine présente à la surface des cellules a été éliminée, les protéines ayant été internalisées sont toujours marquées, puis les cellules sont lysées. L'ensemble des protéines biotinylées (internalisées par la cellule au temps t) sont purifiées sur des billes de Streptavidine et analysées par Western Blot. Les récepteurs Notch 1 et Notch 2 ont été détectés dans les GL15 contrôle (siRNA control) ou déplétées en CRMP5 (siRNA CRMP5). Les deux récepteurs sont constitutivement internalisés (points 1h et 2h) puis recyclés à la membrane (3h) et enfin internalisés à nouveau montrant, en accord avec la bibliographie (McGill, Dho et al. 2009), le trafic des récepteurs en absence du ligand (Figure 26 A). Dans les cellules où CRMP5 est inhibée, les récepteurs Notch sont toujours constitutivement internalisés (points 1h et 2h) montrant que CRMP5 n'a pas de rôle à jouer dans l'endocytose de ces protéines (Figure 26 A). De manière intéressante, au temps 3h, les récepteurs ne semblent pas recyclés à la membrane comme dans le contrôle, au temps 4h l'intensité de la bande est beaucoup plus faible que dans les cellules contrôles suggérant une élimination du récepteur au cours de son trafic intracellulaire (Figure 26 A).

CRMP5 doesn't regulate Notch receptors endocytosis but could control Notch receptor containing endosomes intracellular trafficking by protecting them from degradation.

Numb a été décrite comme responsable de l'internalisation et de la dégradation des récepteurs Notch pendant leur trafic intracellulaire (McGill, Dho et al. 2009). Numb (isoforme 4 principalement) est exprimée dans les cellules de glioblastome avec une voie Notch active ce qui suggère que la protéine joue son rôle dans l'endocytose mais ne peut pas induire la dégradation des récepteurs. CRMP5 pourrait être responsable de cet effet de Numb. De manière endogène, les cellules HEK expriment les récepteurs Notch 1 et Notch 2. La surexpression de Numb 4 (Flag-Numb 4) dans ces cellules résulte, de manière cohérente avec la bibliographie, en la perte d'expression des récepteurs Notch 1 et Notch 2 (Figure 26 B). La surexpression de CRMP5 (GFP-CRMP5) entraîne une augmentation de l'expression des récepteurs Notch comme décrit dans les résultats précédents (Figure 4 B, article, Figure 26 B). La co-transfection des deux protéines, la double transfection des cellules est vérifiée par immunocytofluorescence, résulte en une détection des récepteurs Notch 1 et Notch 2 par western blot, au même niveau d'expression que les cellules non-transfectées (Figure 26 B).

CRMP5 and Numb interact in glioblastoma cells

Figure 27 : **A :** Co-immunoprécipitation de GFP-CRMP5 et Flag-Numb 4 sur lysat de cellules HEK co-transfectées révélé par un anticorps anti-GFP et un anticorps anti-Flag, le contrôle est réalisé avec un anticorps non spécifique de même isotype ; **B :** Représentation schématique des constructions de GST-CRMP5 utilisées pour le GST-Pull Down selon Brot et al.,2010 ; **C :** GST-Pull Down des fragments de CRMP5 fusionnés à la GST sur lysats de cellules HEK transfectées par un plasmide permettant l'expression de Flag-Numb 4, révélation par un anticorps anti-GST comme contrôle et par un anticorps anti-Flag pour la détection de Numb ; **D :** Détection de l'interaction CRMP5/Numb sur les cellules GL15 par Proximity Ligation Assay (rouge) avec des anticorps spécifiques, le DAPI marque les noyaux, la barre d'échelle représente 10µm réels.

These results show directly the protective effect of CRMP5 on Notch receptors degradation by counteracting Numb action.

La localisation subcellulaire de Numb a été étudiée en fonction de l'expression de CRMP5 pour vérifier si un changement de localisation subcellulaire de Numb accompagnait la dégradation lysosomale de Notch. Des cellules GL15 ont été transfectées par des siRNA pour réprimer l'expression de CRMP5 puis des co-marquages de Numb (anticorps reconnaissant toutes les isoformes) avec un marqueur d'endosomes précoces (EEA1, Early Endosome Antigen 1) et un marqueur de lysosomes (Lamp2, Lysosome-associated membrane protein 2) ont été réalisés (Figure 26 C). Dans les cellules GL15 contrôle (siRNA Control), Numb est localisée dans le cytoplasme des cellules avec un co-marquage observable entre Numb et EEA1 alors que le co-marquage avec Lamp2 n'est pas observable (Figure 26 C). Ceci est cohérent avec les précédents résultats montrant que les récepteurs Notch ne sont pas dégradés par les lysosomes dans les cellules GL15 (Figure 26 B, Article). Dans les cellules GL15 déplétées en CRMP5 (siRNA CRMP5), la colocalisation entre Numb et EEA1 (endosomes précoces) n'est plus observable alors qu'un co-marquage de Numb et Lamp2 est présent (Figure 26 C).

As a conclusion, in CRMP5 expressing cells, Numb is localized in early endosomes (EEA1), whereas in CRMP5 depleted cells, Numb is relocalized to lysosomal compartments (Lamp 2). This suggests that CRMP5 action over Numb could take place after notch receptor endocytosis during its intracellular trafficking.

c) CRMP5 interagit avec Numb

L'interaction des protéines Numb 4 et Notch a été recherchée par co-immunoprécipitation sur des lysats de cellules HEK co-transfectées par les plasmides permettant l'expression de GFP-CRMP5 et Flag-Numb 4. La co-immunoprécipitation a été faite en utilisant des anticorps dirigés contre les étiquettes fusionnées aux protéines recombinantes. Les contrôles ont été réalisés avec des immunoglobulines non-spécifiques de la même espèce et du même isotype que l'anticorps utilisé pour l'immunoprécipitation. La protéine GFP-CRMP5 recombinante est immunoprécipitée avec une faible fixation non-spécifique dans le contrôle (Figure 27 A, piste 1), la révélation par un anticorps anti-Flag montre que les protéines Flag-Numb 4 et GFP-CRMP5 co-immunoprécipitent dans cette condition (Figure 27 A, piste 2). L'immunoprécipitation de Flag-Numb 4 recombinante par un anticorps anti-Flag et révélée par un anticorps anti-GFP, montre la co-immunoprécipitation de GFP-CRMP5 (Figure 27 A, piste 3).

This result show that CRMP5 and Numb interacts and could be part of the same protein complex.

Dans le but de confirmer ce résultat obtenu in vitro sur un modèle cellulaire, une expérience de PLA (Proximity Ligation Assay) a été réalisée. Cette technique permet de détecter la très forte proximité de protéines (30nm) sur des cellules par un marquage immunocytofluorescent. Des anticorps spécifiques de CRMP5 et de Numb (toutes les isoformes) ont été utilisés sur des cellules GL15. La technique de PLA a été révélée à l'aide d'un conjugué fluorescent dans le rouge. Le résultat positif sur les cellules montre que l'interaction protéine-protéine démontrée in vitro est également présente dans les cellules (Figure 27 D).

CRMP5/Numb interaction could exist in glioblastoma cells

d) Détermination du domaine d'interaction entre CRMP5 et Numb.

Pour confirmer l'interaction entre CRMP5 et Numb 4, un GST-Pull down a été fait en utilisant des constructions de domaines de CRMP5 fusionnés à la GST (Figure 27 B) (Brot, Rogemond et al. 2010), surproduites en système bactérien et incubées avec un lysat de cellules HEK transfectées pour exprimer Flag-Numb 4. L'analyse par Western blot des précipités révélés par un anticorps anti-GST, montre la précipitation efficace et en quantité équivalente des constructions de domaines de CRMP5 fusionnés à la GST (Figure 27 C). La révélation par un anticorps anti-Flag montre une faible fixation non-spécifique de Flag-Numb 4 avec le contrôle (correspondant à la GST seule exprimée en système bactérien) (Figure 27 C, piste 1). Flag-Numb 4 co-précipite avec la GST-CRMP5 entière (Figure 27 C, piste 2), confirmant le résultat de la co-immunoprécipitation mais aussi avec les constructions Δ C472 et Δ N244 (Figure 27 C, pistes 3 et 4). L'intensité de la bande révélée par l'anticorps anti-Flag dans la précipitation de la construction Δ N474 est égale à l'intensité de la bande détectée dans le contrôle donc les protéines Flag-Numb 4 et Δ N474 ne co-précipitent pas ensemble (Figure 27 C, piste 5). Le domaine d'interaction entre les protéines CRMP5 et Numb 4 se situe donc entre les résidus 244 et 472 de CRMP5.

Interaction between CRMP5 and Numb 4 is confirmed by an other approach. Interaction domain is localized between residus 244 and 472 on CRMP5.

e) L'interaction CRMP5-Numb dissocie l'interaction Numb-Notch

Il a été démontré que CRMP5 protège Notch de la dégradation induite par Numb 4 et que ces deux protéines existent au sein d'une même complexe protéique. CRMP5 pourrait agir au niveau de l'interaction protéique Notch-Numb 4 favorisant ainsi son rôle protecteur contre la dégradation. Par co-immunoprécipitation sur lysats de HEK transfectées par un plasmide permettant l'expression de CRMP5-GFP ou de Numb 4-Flag ou co-transfectées par ces deux plasmides, la présence des récepteurs Notch dans les complexes protéiques co-immunoprécipités est vérifiée. L'immunoprécipitation par un anticorps anti-GFP sur le lysat de HEK transfectées par un plasmide permettant l'expression de CRMP5-GFP est réalisée. Les contrôles faits avec un anticorps non spécifique ne montrent pas de fixation non spécifique (Figure 28 A, piste 1). Les récepteurs Notch1 et Notch 2 ne sont pas détectés co-immunoprécipités avec GFP-CRMP5 (Figure 28 A, piste 2). Ce résultat indique que CRMP5 ne fixe pas directement sur les récepteurs Notch. Les récepteurs Notch 1 et Notch 2 sont détectés co-immunoprécipités avec Numb 4 (Figure 28 A, piste 4) en accord avec la bibliographie (Kwon, Cheng et al. 2011). La protéine CRMP5 ne co-immunoprécipite pas avec les récepteurs Notch 1 et Notch 2 lorsqu'elle est surexprimée avec Numb 4 (Figure 28 A, piste 9). Les récepteurs Notch 1 et Notch 2 ne sont plus détectés en co-immunoprécipitation avec Flag-Numb 4 lorsqu'ils sont surexprimés avec la protéine CRMP5 montrant que l'interaction entre CRMP5 et Numb abolit l'interaction entre Numb et Notch (Figure 28 A, piste 10).

These results show that Notch 1 and Notch 2 receptors are not part of the protein complex containing both CRMP5 and Numb, suggesting that CRMP5 protects Notch receptors from degradation by abolishing Numb/Notch interaction.

CRMP5 abolish Numb/Notch interaction by its interaction with Numb domains implicated in endocytosis

Figure 28 : **A :** Co-immunoprécipitation sur lysat de cellules HEK transfectées surexprimant Flag-Numb 4, CRMP5 ou les deux. Révélation des récepteurs Notch 1 et Notch 2 endogènes dans leur forme membranaire ou clivée par des anticorps spécifiques. Le contrôle d'immunoprécipitation est fait avec des anticorps non spécifiques de même espèce et même isotype que l'anticorps d'immunoprécipitation ; **B :** Principe de la stratégie de puce à peptides utilisée, selon Celluspot®, INTAVIS ; **C :** résultat de la quantification des intensité de Flag-CRMP5 sur la séquence protéique de Numb, les domaines potentiels d'interaction sont encadrés en rouge ; **D :** GST-Pull down des domaines de Numb fusionnés à la GST incubés avec un lysat de HEK transfectées par Flag-CRMP5 puis révéler par l'anticorps anti-Flag ; **E :** Schéma des domaines protéiques de Numb et des domaines putatifs d'interaction de CRMP5 sur Numb ; PTB (Phosphotyrosine Binding motif), PRR (Proline Rich Region), DPF-NPF (motifs impliqués dans l'interaction de Numb avec les protéines d'initiation de l'endocytose).

f) Caractérisation des domaines d'interaction entre CRMP5 et Numb

Il a été montré que la protéine CRMP5 protège les récepteurs Notch de la dégradation induite par Numb et que cet effet est dépendant de l'interaction entre CRMP5 et Numb qui dissocie l'interaction entre Numb et Notch. La première étape est d'identifier le domaine d'interaction précis entre CRMP5 et Numb pour ensuite pouvoir développer des peptides bloquant cette interaction. Une approche de puces à peptide a été utilisée pour identifier ce domaine (Figure 28 B). Des peptides de 15 résidus d'acides aminés ont été immobilisés sur membrane de nitrocellulose. Les peptides couvrent toute la séquence protéique de Numb 4 avec un incrément de 6 résidus entre chaque, soit 98 peptides plus un peptide contrôle. Des cellules HEK sont transfectées par un plasmide permettant l'expression de Flag-CRMP5. Les cellules sont lysées et incubées avec la puce à peptides. La puce est révélée à l'aide d'un anticorps anti Flag pour identifier les points où CRMP5 a été retenue, montrant l'interaction avec un peptide Numb. Les intensités de signaux Flag-CRMP5 sont quantifiées (Figure 28 C). Le résultat montre plusieurs domaines d'interaction entre CRMP5 et Numb, un premier domaine situé entre les résidus 241 et 316, un deuxième au niveau des résidus 361-400 et un dernier domaine situé entre les résidus 559-570 et 577-592 (Figure 28 C). Tous ces domaines sont situés dans le domaine PRR et les régions DPF-NPF de Numb, impliqués dans ses fonctions d'endocytose. Pour confirmer l'interaction de CRMP5 avec ce domaine PRR, un GST-Pull down a été réalisé avec des constructions de Numb, du domaine PTB ou du domaine PRR de Numb 4 fusionnés à la GST et exprimés en système bactérien (Figure 9 D). L'incubation de ces constructions avec un lysat de HEK transfectées par Flag-CRMP5 et révélé en western blot avec l'anticorps spécifique anti-Flag, montre une co-précipitation de CRMP5 avec le domaine PRR de Numb (Figure 28 D).

These results uncover 3 interaction domains between CRMP5 and Numb between amino acids 241-316, 361-400 and 559-570 (DPF) 577-592(NPF). These domains are located on the PRR domain of Numb implicated in Notch receptor endocytosis (Figure 28 E) confirming previous observations suggesting that CRMP5 action over Numb occurs after Notch receptors endocytosis to allow constitutive activation of the pathway.

CONCLUSIONS

Au cours de cette thèse, Je me suis intéressé au rôle de CRMP5 dans une tumeur du cerveau, le glioblastome. L'expression de CRMP5 a été montrée au niveau protéique dans cette tumeur et reliée à la plus faible survie des patients. Une nouvelle fonction pour CRMP5 dans la prolifération des cellules tumorales a été identifiée et met en jeu l'activation de la voie Notch dépendante de CRMP5. D'un point de vue mécanistique, nous avons montré que CRMP5 régule, de manière post-traductionnelle, la stabilité des récepteurs Notch par l'inhibition de leur dégradation dépendante de l'E3 ubiquitine ligase Itch. Plus précisément, l'action de CRMP5 a été définie par son interaction avec Numb, la protéine responsable de la dégradation des récepteurs Notch en conditions physiologiques. CRMP5 abolit l'interaction entre Numb et les récepteurs Notch, résultant en l'activation constitutive de la voie de signalisation et de la prolifération dans les glioblastomes. Le ciblage de cette interaction peut être une approche intéressante pour le traitement de cette tumeur extrêmement agressive.

Ces résultats apportent une nouvelle fonction à CRMP5 dans la prolifération des glioblastomes reliée à la voie Notch. L'interaction entre CRMP5 et Numb permet d'aborder un nouveau mécanisme de régulation de la voie de signalisation en conditions pathologiques soulevant de nombreuses questions sur le rôle de CRMP5 dans la formation des tumeurs d'une part et dans le développement du système nerveux d'autre part. Ces points seront discutés dans ces chapitres pour proposer un rôle plus large de CRMP5 comme protéine versatile.

I- CRMP5 : un nouveau régulateur de la voie Notch dans les glioblastomes

1° Une nouvelle fonction pour CRMP5 dans la prolifération des glioblastomes

L'expression de CRMP5 dans un contexte tumoral a été précédemment étudiée par notre équipe dans les cancers à petites cellules neuroendocrines du poumon (Meyronet, Massoma et al. 2008). Dans le contexte du glioblastome, une étude transcriptomique sur 20 tumeurs a identifié CRMP5 comme marqueur de faible survie et associé à un cluster de gènes associés à la prolifération (Liang, Diehn et al. 2005). Nous avons confirmé l'expression de CRMP5 à un niveau protéique dans plusieurs modèles de glioblastomes, lignées cellulaires, cellules souches, xénogreffes de GBM et tumeurs de patients. Par immunocytofluorescence, la localisation cytosolique et nucléaire de CRMP5 a été détectée similaire à celle des tumeurs du poumon (Meyronet, Massoma et al. 2008) et une autre publication du laboratoire sur les glioblastomes (Brot, Mallevat et al. 2013). Par fractionnement cellulaire, nous avons montré la localisation membranaire, cytoplasmique, nucléaire et associée au cytosquelette de CRMP5 dans deux lignées cellulaires de glioblastome. Plusieurs formes de CRMP5 ont été identifiées selon les compartiments, les fractions membranaires et cytoplasmiques contiennent deux formes de CRMP5 à 66kDa et 62kDa. La forme à 62kDa correspond au poids moléculaire théorique de CRMP5 et correspond donc à la protéine native sans modifications post-traductionnelles

alors que l'isoforme à 66kDa peut correspondre à une forme phosphorylée de la protéine présente uniquement dans ces deux compartiments. Au cours de notre travail, la forme à 66kDa n'a été détectable que sur des extraits frais dénaturés immédiatement après le fractionnement cellulaire (le fractionnement a été réalisé en absence d'inhibiteurs de phosphatases) alors que lors d'un deuxième western blot après décongélation des échantillons, la bande à 66kDa a disparu, renforçant l'idée que c'est une forme phosphorylée plus fragile de CRMP5. La bande de 64kDa détectée dans la fraction nucléaire peut-elle correspondre à une phosphorylation différente de CRMP5 qui permettrait d'exposer le site de localisation nucléaire par l'ouverture de la conformation de la protéine (les sites de phosphorylation sont situés dans le domaine C-terminal non structuré). Cette bande a été également perdue lors d'une seconde analyse des mêmes échantillons renforçant l'idée de la phosphorylation de cette forme nucléaire. Il est surprenant de voir que la forme de CRMP5 associée au cytosquelette est une forme plus courte (58kDa) que la protéine entière (62kDa) du fait qu'il n'y a pas de variant d'épissage décrits pour CRMP5 (Inatome, Tsujimura et al. 2000), il est possible que cette bande corresponde à la forme de CRMP5 issue du clivage par la Calpaïne (Jiang, Kappler et al. 2007). Si l'association avec les microtubules dépend du clivage de la calpaïne, l'utilisation d'un inhibiteur de cette enzyme pour inhiber le clivage de CRMP5 peut résulter en la perte de sa localisation au niveau du cytosquelette et de son interaction avec la tubuline.

Ce fractionnement cellulaire permet d'apporter de nombreuses nouvelles informations sur la régulation de la localisation de CRMP5 car la forte phosphorylation (bande à 66kDa) de la protéine est associée à une localisation cytoplasmique ou membranaire alors qu'une phosphorylation différente (bande à 64kDa) va promouvoir sa translocation dans le noyau. Ces formes phosphorylées peuvent être caractéristiques de ce modèle tumoral comme pour CRMP2 où il a été montré que la phosphorylation du résidu T555 est caractéristique de cellules tumorales et associée à la prolifération (Tahimic, Tomimatsu et al. 2006) Les sites de phosphorylation décrits pour CRMP5 sont les résidus T509, T514, T516 et S534, par homologie avec CRMP2, un seul site de phosphorylation est homologue entre ces deux protéines, la T509 (équivalente à la T514 de CRMP2). Une phosphorylation sur un résidu de tyrosine avait été identifiée pour CRMP5 (Inatome, Tsujimura et al. 2000). Par homologie avec CRMP2 où la phosphorylation du résidu Y479 par une Src kinase avait été décrite, le résidu d'acide aminé équivalent Y472 doit être phosphorylé car la région est très conservée entre les isoformes des CRMP. Le site de localisation nucléaire (NLS) de CRMP5 est accessible dans la conformation du dimère ou du monomère de CRMP5 selon la structure publiée (Brot, Mallevat et al. 2013). En effet, dans cette structure, le domaine C-terminal de CRMP5 est situé du côté opposé au site NLS mais ne semble pas accessible dans la conformation tétramérique de CRMP5 car il serait recouvert par le domaine C-terminal d'une autre sous-unité CRMP5. Ces données suggèrent que la régulation de la localisation

nucléaire se fait sur le domaine C-terminal de CRMP5 (non-structuré) et par une modification post-traductionnelle qui pourrait induire un changement conformationnel suffisant pour l'exposition du site NLS. Concernant le rôle des phosphorylations de CRMP5 en relation avec sa localisation nucléaire, des modifications structurales de la protéine en fonction de la phosphorylation des 4 résidus phosphorylés décrits (T509, T514, T516 et S534) ont été étudiées sur la base du remplacement des acides aminés d'intérêt par un résidu aspartate qui mime une phosphorylation d'un résidu de thréonine ou sérine. Si le remplacement d'acide aminé (mimant une phosphorylation) induit un changement de conformation profond (zone non structurée changée en boucle β ou hélice α) cela suppose une ouverture de la conformation du domaine C-terminal de CRMP5 qui pourrait résulter en l'exposition du site de localisation nucléaire. En utilisant des matrices de prédictions de structures par 4 méthodes différentes (méthodes basées sur l'homologie ou sur des statistiques), la structure du fragment C-terminal de CRMP5 contient une structure en hélice α entre les résidus R526 et S531, les autres domaines étant non-structurés. Les phosphorylations individuelles des sites T509, T514, T516 et S534 de CRMP5 n'entraînent pas de changement, prédit, de la structure de la protéine. La phosphorylation (mimée par un résidu aspartate) des sites T509 et T516 a résulté en un changement conformationnel du motif en hélice α vers une zone non structurée suggérant une linéarisation de domaine, donc une plus grande flexibilité, qui peut être impliquée dans l'inaccessibilité du site de localisation nucléaire. Les autres combinaisons de deux sites phosphorylés n'ont pas abouti à un changement de conformation alors que la mutation des sites T509, T514 et T516 en un résidu aspartate résulte en un domaine entièrement non-structuré. Enfin, si les 4 sites de phosphorylation sont mutés (thréonine en aspartate), le changement de conformation est aboli. Ces données prédites suggèrent que la phosphorylation de la T509 (site de phosphorylation conservé de la GSK-3 β) avec la phosphorylation du site T516 sont clés dans l'ouverture de la conformation de CRMP5 pour permettre l'exposition du site de localisation nucléaire. Le résidu S534 serait un site régulateur car sa phosphorylation (mimée par un aspartate) a aboli le changement conformationnel. L'activité de GSK-3 β qui semble importante dans ce mécanisme de translocation nucléaire de CRMP5, n'a jamais été reliée à l'activation de la voie Notch, il est donc difficile de relier la localisation nucléaire de CRMP5 à cette voie.

Dans le glioblastome, la forme de CRMP5 associée au cytosquelette semble être issue d'un clivage. L'enzyme décrite dans le clivage des CRMP est la Calpaïne (Jiang, Kappler et al. 2007; Zhang, Ottens et al. 2007) mais il n'est pas connu si une préférence des isoformes de cette enzyme est applicable pour les CRMP. Des formes courtes de CRMP2, probablement issues du clivage par la Calpaïne, sont localisées au niveau du cytosquelette et dans le noyau (Bretin, Rogemond et al. 2006; Rogemond, Auger et al. 2008). La forme courte issue du clivage par la Calpaïne de CRMP3 est

également transloquée dans le noyau (Kimura, Kudoh et al. 2011). Le fait que la forme nucléaire de CRMP5 ne soit pas la forme courte issue d'un clivage serait une caractéristique de cette protéine par rapport aux autres membres de la famille. La caractérisation du rôle de ce clivage dans l'interaction avec la tubuline et avec les autres CRMP permettra d'avancer dans la compréhension du rôle des tétramères de CRMP dans le remodelage du cytosquelette et la migration. Ces résultats de localisation sub-cellulaire de CRMP5 dans les glioblastomes sont différents de ceux précédemment publiés. Nous montrons une localisation cytosolique (66kDa), membranaire (66kDa), nucléaire (64kDa) et cytosquelette (58kDa) de CRMP5 dans des cellules de glioblastome GL15 alors qu'il n'a été décrit qu'une forme courte de CRMP5 (58kDa) nucléaire (Brot, Malleval et al. 2013). Ces différences sont certainement dues à une différence de lot d'anticorps anti-CRMP5 utilisé (variabilité de l'anticorps entre les lots de purifications), de plus dans cette étude, l'expression de CRMP5 dans le cytosquelette n'avait pas été évaluée.

Deux motifs d'expression de CRMP5 ont été identifiés sur des glioblastomes humains et reliés à la survie des patients pour confirmer les résultats issus de l'étude de transcriptomique précédemment publiée (Liang, Diehn et al. 2005). L'expression forte et homogène de CRMP5 est corrélée à une plus faible survie des patients. A partir de ces données, il est intéressant de définir si l'expression de CRMP5 pourrait être reliée à un des sous-groupes de glioblastomes décrits dans la classification moléculaire (Verhaak, Hoadley et al. 2010). Nous avons eu accès aux résultats d'expression normalisés issus des puces du TCGA pour évaluer l'expression de l'ARNm de CRMP5. Les valeurs d'expression de CRMP5 sont assez homogènes, les résultats suggèrent que l'expression de CRMP5 serait associée aux sous-groupes Proneural et Classique alors que les sous-groupes Neural et Mésenchymateux sont plutôt négatifs pour l'expression de CRMP5 (ARNm). Ces deux sous-groupes exprimant CRMP5 font partie des glioblastomes les moins différenciés, avec une activation des voies de signalisation impliquées dans le maintien des cellules souche tumorales (Verhaak, Hoadley et al. 2010). Le sous-groupe Classique est caractérisé par l'expression du gène *nes* (Nestine) qui est une cible de la voie Notch, les autres gènes cibles de Notch, *hes 1*, *hey 1* ainsi que les récepteurs Notch 1 et Notch 2 sont très exprimés suggérant que cette voie de signalisation est très active dans ces tumeurs (Verhaak, Hoadley et al. 2010). Pour confirmer ces résultats de transcriptomique, des puces à tissus (TMA) ont été utilisées pour évaluer l'expression protéique de CRMP5 dans une série de glioblastomes identifiés dans la classification moléculaire (résultats non montrés, David Meyronet). Les résultats obtenus avec les TMA divergent de ceux issus de la transcriptomique car sur les 24 tumeurs classées, l'expression forte ou faible de CRMP5 a été détectée dans tous les sous-types moléculaires. Ces résultats suggèrent une régulation forte de l'action de CRMP5 par des modifications post-

traductionnelles dans les glioblastomes, et ainsi révèlent les limitations des analyses de transcriptomique pour l'étude du gène *dpysl5* (CRMP5).

Dans notre cohorte de 183 glioblastomes, les tumeurs exprimant fortement CRMP5 ont montré une prolifération plus importante comparée aux glioblastomes avec une expression faible de CRMP5, suggérant un nouveau rôle pour CRMP5 dans la prolifération. Cette fonction a été confirmée *in vitro* sur plusieurs modèles cellulaires de glioblastome (lignée GL15 et culture primaire) où la prolifération a été montrée dépendante de l'expression de CRMP5 par le contrôle de la transition G1/S et de l'expression de la Cycline D1. Ces résultats apportent des précisions à un autre article ayant associé une forme courte nucléaire de CRMP5 (résidus 1-472) à la prolifération de cellules de neuroblastome (Brot, Mallevall et al. 2013). Nos résultats de perte d'expression (siRNA) ou de surexpression (transfection) montrent un rôle actif pour la forme longue de CRMP5 dans la prolifération qui n'avait pas été abordée dans cet article. Pour compléter l'étude du rôle de la localisation nucléaire de CRMP5 dans la prolifération il sera nécessaire d'utiliser une construction de CRMP5 entière mutée sur son site de localisation nucléaire car les constructions précédemment utilisées (amputée de 92 résidus d'acides aminés, 52kDa) ne reflètent pas la réalité de la forme courte (58kDa) de CRMP5 dont la composition et l'origine ne sont pas encore connues.

L'étude du rôle de CRMP5 dans la croissance des glioblastomes *in vivo* chez la souris après injections orthotopiques de cellules tumorales n'a pas pu être achevée à cause de limitation de stabilité des cellules shRNA CRMP5. Ce résultat reste cependant très intéressant à obtenir pour confirmer *in vivo* les résultats présentés dans cette thèse mais également pour estimer l'efficacité du blocage de l'expression de CRMP5 sur la croissance des GBM *in vivo*. Une approche virale pour bloquer l'expression de CRMP5 pourrait permettre d'étudier la réponse des glioblastomes aux divers traitements en fonction de l'expression de CRMP5 et d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes de tumorigénèse.

2° L'activation de la voie de signalisation Notch dans la prolifération est dépendante de CRMP5

La voie de signalisation Notch est très importante dans les glioblastomes puisque son activation est reliée à la plus faible survie des patients (Hulleman, Quarto et al. 2009), au maintien (Fan, Matsui et al. 2006) et la prolifération des cellules souches tumorales par le contrôle de la transition G1/S (Fan, Khaki et al. 2010) ainsi qu'à la résistance des tumeurs aux traitements (Zhu, Costello et al. 2011). Nous avons montré que l'activation de la voie Notch est dépendante de l'expression de CRMP5 dans les glioblastomes tant au niveau de l'expression des récepteurs que des gènes cibles *hes1/hey1 in vitro*. Sur les tumeurs humaines, nous avons mis en évidence une très faible expression du récepteur Notch dans les glioblastomes exprimant faiblement CRMP5. De même, l'expression de la protéine Hes1 est beaucoup plus forte dans les glioblastomes exprimant fortement CRMP5 par rapport aux autres. Ces résultats montrent que l'expression de CRMP5 est reliée à l'activation de la voie Notch. L'évaluation du rôle de CRMP5 dans les mécanismes associés à cette voie de signalisation permet d'envisager l'ampleur du rôle de CRMP5 dans les glioblastomes. Une première cible a été la protéine Akt dont l'activation est dépendante de la voie Notch dans les glioblastomes (Xu, Qiu et al. 2010; Zhang, Chen et al. 2012) et résulte en une protection des cellules par rapport à l'apoptose, en l'activation de la prolifération et la résistance aux traitements. Nous avons montré que l'activation d'Akt par phosphorylation (S473) est également dépendante de l'expression de CRMP5 et du fait que CRMP5 contrôle l'activation de la voie Notch, on peut supposer que l'effet observé sur Akt est entièrement médié par la modulation de la voie Notch dépendante de CRMP5. Cet effet n'a pas été retrouvé sur les cibles d'Akt, les protéines mTor et p70S6K, suggérant que l'activation d'Akt dans la lignée GL15 est indépendante de mTor et de ses cibles. Bien qu'en général l'activation de la voie Akt conduit à l'activation de la voie mTor, il a été montré que les inhibiteurs de mTor ne sont efficaces que dans un certain type de glioblastome avec une mutation activatrice du gène de l'EGFR (EGFRvIII) concomitante à la perte de l'anti-oncogène PTEN (Gini, Zanca et al. 2013). Cette population correspond aux caractéristiques des glioblastomes du sous-groupe Classique selon la classification moléculaire (Verhaak, Hoadley et al. 2010). L'activation de la voie Notch est impliquée dans la résistance des cellules à l'apoptose par l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2. La perte de CRMP5 peut donc résulter en une augmentation de l'apoptose due à la perte de la voie Notch. L'apoptose de la lignée GL15 a été évaluée par TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling), aucune variation de l'apoptose des cellules n'a été observée lors du blocage de l'expression de CRMP5 (siRNA) par rapport au contrôle ce qui montre que la diminution de prolifération observée est réellement due à un blocage du cycle cellulaire et non à une augmentation de l'apoptose.

3° Un rôle pour CRMP5 dans le maintien du caractère souche de cellules souches de glioblastome ?

Des cellules souches ont été découvertes dans le glioblastome et caractérisées comme cellules résistantes aux traitements actuels (Singh, Clarke et al. 2004; Bao, Wu et al. 2006). La population de ces cellules souches est maintenue au sein de la tumeur par l'activité de la voie Notch qui va promouvoir l'autorenouvellement de ces cellules (Shih and Holland 2006). La modulation de Notch a été décrite dans trois fonctions particulières des cellules souches, la différenciation, la prolifération et la quiescence (Fan, Khaki et al. 2010). Comme il a été montré dans nos résultats, CRMP5 est exprimée dans deux modèles de cellules souches *in vitro* et son expression est perdue au cours de la différenciation de ces cellules de même que l'expression des récepteurs Notch 1 et Notch 2. Ceci suggère que CRMP5 régule Notch au cours de la différenciation de ces cellules. L'étude de la régulation de l'expression de CRMP5 apportera une nouvelle compréhension des mécanismes de différenciation des cellules souches neurales et tumorales. Dans un modèle de souris déficiente pour le gène *dpysl5*, la perte de CRMP5 entraîne, dans les zones de neurogenèse chez l'adulte (gyrus denté), une augmentation de la prolifération des cellules souches neurales et une forte apoptose cellulaire (Veyrac, Reibel et al. 2011). Considerant nos résultats et le fait qu'une forte apoptose de ces cellules a été observée dans les souris KO CRMP5, ceci suggère que la voie de signalisation Notch n'est pas pleinement active dans ces cellules pour les protéger de l'apoptose. Ces données introduisent un rôle pour CRMP5 dans l'interface avec d'autres voies de signalisation comme la voie Akt dans le maintien des cellules souches neurales et tumorales. Au niveau de la prolifération de cette population de cellules, l'inhibition de l'expression de CRMP5 (siRNA) dans les neurosphères issues de xénogreffe de glioblastome a résulté en une forte diminution de leur prolifération, montrant le rôle de CRMP5 dans la prolifération et l'autorenouvellement de ces cellules (données non montrées). L'activation de la voie Notch n'a pas été étudiée dans cette expérience. Pris ensemble, ces résultats avec les données bibliographiques suggèrent que l'expression de CRMP5 pourrait contrôler le maintien et la prolifération de la population de cellules souches tumorales au sein d'un glioblastome contrairement à ce qui est observé dans des zones de neurogénèse chez l'adulte.

La question restante a été de savoir si la voie Notch peut également réguler l'expression de CRMP5 pour favoriser sa propre activation. L'inhibition du complexe γ -secretase donc de la voie Notch n'a pas altéré le taux d'expression de CRMP5 dans la lignée GL15 ou son clivage (données non montrées), ce qui montre un contrôle unilatéral de CRMP5 sur la voie Notch. Dans le contexte des cellules souches tumorales, ceci suggère que la régulation de l'expression de CRMP5 serait au centre de l'engagement de ces cellules vers la prolifération, la quiescence ou la différenciation.

4° CRMP5 contrôle la stabilité des récepteurs Notch en protégeant leur dégradation

Lors de l'inhibition de l'expression de CRMP5, l'expression des récepteurs Notch 1 et Notch 2 a été perdue alors que l'expression de l'ARNm de ces récepteurs n'a pas été impactée. Ceci suggère une action post-traductionnelle de CRMP5 sur Notch. Nous avons montré que les récepteurs Notch 1 et Notch 2 sont dégradés dans les lysosomes lors de la perte de CRMP5 (siRNA). Dans cette expérience, le traitement des cellules avec les inhibiteurs de protéasome et de lysosome n'a pas résulté en la restauration de Hes 1 montrant en accord avec les résultats d'activation de promoteur et de qPCR que la perte d'expression du gène cible de Notch *hes 1* est bien due à une perte d'activation de son promoteur et non à une dégradation accrue de la protéine. Les effets de perte d'expression de CRMP5 ont pu être restaurés par l'inhibition de l'expression de l'E3 ubiquitine ligase Itch responsable de la dégradation des récepteurs Notch (Chastagner, Israel et al. 2008). Ces résultats montrent le rôle précis de CRMP5 dans l'activation de la voie de signalisation Notch par l'inhibition de l'action de l'enzyme Itch sur les récepteurs Notch.

II- CRMP5 : un nouveau régulateur de Numb, l'inhibiteur de Notch

1° CRMP5 interfère dans la fonction d'ubiquitination dépendante de Numb mais pas l'endocytose

Numb est la protéine responsable de la dégradation des récepteurs Notch par le recrutement de l'E3 ubiquitine ligase Itch pour promouvoir leur adressage dans les lysosomes. Nous avons montré que l'expression de Numb est indépendante de CRMP5 et que l'expression de Numb dans des cellules de glioblastome contenant CRMP5 ne résulte pas en une perte de la voie de signalisation Notch, suggérant que CRMP5 peut contrôler le rôle inhibiteur de Numb sur la voie Notch. Plus précisément, Nous avons montré que CRMP5 n'interfère pas dans l'internalisation des récepteurs Notch mais qu'elle pouvait contrer la dégradation de Notch dépendante de Numb. De plus, la protéine Numb est relocalisée dans les lysosomes en absence de CRMP5 montrant que la protéine joue son rôle de recrutement de l'E3 ubiquitine ligase Itch impliquée dans la dégradation de Notch en absence de CRMP5. Considérant cette hypothèse, il est possible que CRMP5 interfère avec d'autres fonctions de Numb reliées au recrutement d'E3 ubiquitine ligases. Numb interagit avec HDM2 pour protéger p53 de la dégradation (Colaluca, Tosoni et al. 2008), nous avons montré que CRMP5 ne jouait pas de rôle dans cette fonction puisque p53 est exprimée dans les cellules GL15 et A172 et la perte de l'expression de CRMP5 (siRNA) résulte en une perte de l'expression de la protéine p53 (western blot). CRMP5 ne semble donc pas inhiber le rôle de Numb dans la stabilisation de p53 (données non montrées). Numb est également capable d'induire la dégradation du facteur de transcription Gli 1 par Itch (Di Marcotullio, Ferretti et al. 2006) or la perte d'expression de Gli 1 a été observée par western blot sur les cellules GL15 déplétées en CRMP5 (siRNA) montrant que le rôle de CRMP5 se situe au-delà de la voie Notch (données non montrées) et pourrait interférer avec les fonctions de Numb reliée au recrutement de Itch. Il est également possible que CRMP5 agisse sur Itch directement dans le mécanisme d'ouverture la conformation de la protéine nécessaire à son activité (Di Marcotullio, Greco et al. 2011). Cette hypothèse reste à être testée.

L'inhibition de Numb par CRMP5 est médiée par une interaction entre les deux protéines que nous avons montrée par plusieurs techniques. Le domaine d'interaction de CRMP5 avec Numb semble se situer entre les résidus 244-472 de CRMP5. Les expériences ne permettent pas de conclure sur le caractère direct de cette interaction car il aurait fallu utiliser des protéines purifiées pour être sûr qu'il n'y a pas d'intermédiaire protéique entre CRMP5 et Numb. Néanmoins, les expériences de GST-Pull down montrent que les deux protéines sont capables de s'associer *in vitro*. De plus la détection de l'interaction par la technique de proximité de ligation, PLA sur les cellules GL15 montre que les deux protéines sont proches à moins de 30nm, il reste peu de place pour un troisième partenaire protéique

à cette distance. Ces résultats rendent assez solide l'hypothèse par laquelle CRMP5 et Numb pourrait interagir de manière directe. Le domaine d'interaction entre CRMP5 et Numb est différent du domaine d'interaction de CRMP5 avec la tubuline (Brot, Mallevall et al. 2013) suggérant que ces deux interactions protéiques ne sont pas exclusives et que CRMP5 pourrait jouer un rôle d'adaptateur dans le trafic intracellulaire de vésicules dépendant de Numb.

Par ailleurs, un autre membre de la famille des CRMP, la CRMP2 a été décrite comme interagissant avec Numb dans l'endocytose de molécule d'adhésion L1-CAM dans la croissance axonale (Nishimura, Fukata et al. 2003).

2° L'interaction entre CRMP5 et Numb protège les récepteurs Notch de la dégradation induite par Numb

La fonction de Numb est d'inhiber la voie de signalisation Notch par son interaction avec un récepteur Notch et l'E3 ubiquitine ligase Itch. L'interaction entre CRMP5 et Numb dissocie l'interaction entre Numb et Notch suggérant un rôle pour CRMP5 dans la régulation de l'interaction de Numb avec Notch. L'étude de la régulation de cette interaction peut mener à une meilleure compréhension des mécanismes régulant la voie de signalisation Notch et les fonctions qui lui sont associées. Au-delà du simple fait que l'interaction entre CRMP5 et Numb peut être un inhibiteur compétitif de l'interaction entre Numb et Notch, il est possible que CRMP5 soit responsable d'une modification post-traductionnelle de la protéine Numb. Il sera intéressant de vérifier l'état de phosphorylation de Numb en fonction de l'expression de CRMP5 comme première approche puisque la régulation de Numb par phosphorylation est largement décrite (Sato, Watanabe et al. 2011). Une autre hypothèse restant à tester est que CRMP5 pourrait inhiber le recrutement de l'E3 ubiquitine ligase Itch par Numb.

Le rôle de CRMP5 par rapport à la voie Notch et Numb a été clarifié au cours de ce travail et permet une compréhension du rôle de CRMP5 dans la protection du récepteur Notch contre la dégradation par Numb grâce à son interaction avec Numb. La caractérisation de cette interaction ouvre potentiellement sur des cibles thérapeutiques très intéressantes pour le traitement des glioblastomes. La dissociation de l'interaction CRMP5/Numb par un peptide leurre peut résulter en la libération de Numb entraînant le récepteur Notch vers la dégradation lysosomale et une perte des voies de signalisation Notch et Sonic Hedgehog impliquées dans la prolifération, le maintien et l'autorenouvellement des cellules souches de glioblastome. Le domaine d'interaction précis entre les deux protéines a été abordé et montré sur trois domaines de Numb impliqués dans ses fonctions d'endocytose. L'utilisation d'agents bloquant de cette interaction peut donc fortement diminuer la prolifération des cellules de glioblastome. Une approche de peptides bloquant a déjà été efficacement

utilisée pour bloquer l'interaction de CRMP2 avec CaV2.2 (Canal Calcique voltage-dépendant) et traiter la douleur chronique (Brittain, Duarte et al. 2011). Dans le cas du glioblastome, un peptide mimant le domaine d'interaction de Numb sur CRMP5 pourrait inhiber l'interaction entre ces deux protéines. CRMP5 ne serait plus capable de protéger la voie Notch qui sera inhibée par l'action de Numb en synergie avec Itch. L'inhibition résultante des voies de signalisation Notch et Sonic Hedgehog dans les cellules souches pourrait résulter en l'induction de leur différenciation du fait de la perte d'inhibition de l'expression des facteurs de différenciation par les protéines Hes 1 et Hey 1. Les cellules ainsi différenciées pourront être éliminées par des approches de chimiothérapie ou radiothérapie et la tumeur ne pourra pas reprendre car la population de cellules souches aura été éliminée par le blocage de l'interaction CRMP5/Numb.

Modèle de l'action de CRMP5 par l'activation de la voie Notch dans les glioblastomes

Figure 29 : CRMP5 protège les récepteurs Notch de la dégradation induite par Numb et Itch résultant en l'activation constitutive de la voie de signalisation, l'augmentation de l'activation d'Akt et une forte prolifération des cellules tumorales. Ces événements sont reliés à une plus faible survie des patients, introduisant l'expression CRMP5 comme un facteur de mauvais pronostic dans les glioblastomes

Perspectives

III- CRMP5 : un acteur dans la progression tumorale?

1° CRMP5 et progression tumorale

Les résultats obtenus au cours de ma thèse introduisent un nouveau rôle pour CRMP5 comme potentiel oncogène. L'expression de CRMP5 dans plusieurs modèles cellulaires résulte en une augmentation de l'expression des récepteurs Notch et de l'expression du gène cible de Notch, *hes 1*. L'activation de la voie Notch seule n'est pas suffisante pour induire une tumeur de haut grade. Un deuxième évènement oncogène doit être présent pour potentialiser la suractivation de la voie Notch et résulter en la transformation tumorale de cellules saines (Allen, Rodriguez et al. 2011; Natarajan, Li et al. 2013). L'expression de CRMP5 a été montrée dans une population de glioblastomes avec une prolifération accrue dépendante de la voie de signalisation Notch. Il est peu probable que l'expression de CRMP5 seule soit suffisante à induire la transformation tumorale d'une cellule saine considérant l'activation de la voie Notch. Il a été proposé que l'expression des récepteurs Notch soit reliée au grade des astrocytomes (tumeur du cerveau de grade I à IV). Les plus hauts grades (III et IV) exprimant plus fortement ces protéines (Xu, Yu et al. 2009). L'expression de CRMP5 pourrait être nécessaire à la formation d'un gliome de haut grade pour induire une forte expression des récepteurs menant à une forte activité de la voie de signalisation. Une autre piste pour aborder le rôle de CRMP5 dans la tumorigénèse vient du rôle de l'homologue drosophile avec Numb dans les mouvements du centrosome au cours de la division asymétrique. La régulation du centrosome est une étape importante dont la dérégulation peut mener à une instabilité génétique favorisant la formation de tumeurs de haut grade. Des anomalies de localisation des centrosomes ou un surnombre de centrosomes ont été décrites associées au glioblastome (Loh, Lieu et al. 2010). L'expression de CRMP5 et Numb dans une des deux cellules filles au cours de la division asymétrique chez la drosophile, résulte en un mouvement asymétrique du centrosome. L'expression de CRMP dans les deux cellules de la division asymétrique provoque un mouvement tardif du centrosome (Jauffred, Llense et al. 2013) qui peut entraîner une instabilité génétique. Dans la lignée GL15 déplétée en CRMP5 (siRNA) de nombreuses cellules sont multinucléées (observations personnelles) ce qui révèle des anomalies de la mitose qui sont peut-être dues à une dérégulation des mouvements du centrosome dépendants de CRMP5. Ces erreurs au cours de la mitose et la division asymétrique dues à l'expression de CRMP5 peuvent faire partie des évènements oncogènes impliqués dans la formation des glioblastomes

Dans le contexte du cancer du poumon, CRMP5 n'est exprimée que dans le sous-type le plus agressif de ces tumeurs, le carcinome neuroendocrine à petites cellules (Meyronet, Massoma et al. 2008). La voie de signalisation Notch n'a été décrite que dans les carcinomes du poumon non à petites cellules, il est donc difficile d'envisager un rôle pour CRMP5 par rapport à Notch dans ce type de

cancers. L'étude de l'activation de cette voie de signalisation dans les tumeurs exprimant CRMP5 permettra de vérifier si les résultats que nous avons obtenus dans le glioblastome peuvent être applicables à un autre système indépendant du système nerveux.

Un dernier modèle intéressant pour envisager le rôle de CRMP5 dans la formation de tumeurs est les tumeurs de la gaine du nerf (MPNST, Malignant Peripheral Nerve Sheat Tumors, WHO grade III) dérivées des cellules de Schwann. CRMP5 est exprimée dans les cellules de Schwann (Camdessanche, Ferraud et al. 2012). Son expression dans ces cellules est régulée par deux facteurs extracellulaires l'AMPc et la Neureguline de type 1 capables d'induire l'expression de la protéine (Camdessanche, Ferraud et al. 2012). Au cours des mécanismes de régénération des nerfs, l'expression de CRMP5 est augmentée dans les cellules de Schwann en réponse à ces deux facteurs. De plus, ces évènements ont été montrés associés à un phénomène de dédifférenciation de ces cellules (Camdessanche, Ferraud et al. 2012). Cette étape implique également l'activation de la voie de signalisation Notch dans les cellules de Schwann (Woodhoo, Alonso et al. 2009). Ces données suggèrent une synergie entre l'expression de CRMP5 et Notch dans la régénération des gaines des nerfs. De manière intéressante, l'activation de Notch 1 par transduction de son domaine intracellulaire dans les cellules de Schwann a résulté en leur transformation tumorale par dédifférenciation. L'implantation *in vivo* des cellules transformées a permis la formation de tumeurs identifiées comme faisant partie du groupe des MPNST, montrant que dans ce modèle, l'activation seule de la voie Notch est capable d'induire un cancer de haut grade (Li, Rao et al. 2004). La neurofibromatose est une maladie génétique issue de mutations de perte de fonction sur l'anti-oncogène NF1. Cette maladie est caractérisée par une apparition constante de tumeurs comme des Schwannomes (WHO, grade I), des gliomes optiques de l'enfant (WHO, grade II) et des MPNST (WHO, grade III) (Friedman 1999). Les cellules de Schwann issues de patients mutés sur le gène NF1 expriment fortement la Neureguline de type 1 (Kazmi, Byer et al. 2013) et ont un métabolisme aberrant de l'AMPc (Dang and De Vries 2011). Ces deux facteurs ont été décrits pour induire la formation des MPNST car le modèle de souris surexprimant la Neureguline de type 1 est un modèle de ce type de tumeurs (Kazmi, Byer et al. 2013). Pris ensemble, ces données suggèrent que dans la Neurofibromatose de type 1, la forte production de Neureguline de type 1 et d'AMPc pourraient induire l'expression permanente de CRMP5 dans les cellules de Schwann. CRMP5 activerait à son tour la voie de signalisation Notch résultant en la dédifférenciation des cellules de Schwann et l'induction de leur transformation tumorale. Cette hypothèse semble intéressante pour étudier le potentiel oncogène de CRMP5.

2° CRMP5, un nouvel acteur dans la division asymétrique des cellules souches de glioblastome

Les glioblastomes sont des tumeurs résistantes aux traitements par une population de cellules souches résistantes et responsables de la reprise de la tumeur. La division asymétrique de ces cellules est un évènement majeur dans le maintien de cette population. La matrice d'endocytose est une vision dynamique de la division asymétrique permettant d'aborder sous un angle nouveau les mécanismes impliqués dans la décision de l'engagement vers la différenciation de l'une des deux cellules filles (Pece, Confalonieri et al. 2011). Cette fonction est directement dépendante de l'inhibition de la voie de signalisation Notch dans cette cellule par Numb (Spana and Doe 1996). La régulation de Numb est donc un point important dans la décision du devenir des deux cellules au cours de la division asymétrique. La localisation asymétrique de Numb a été largement décrite chez la drosophile et les mammifères et reliée à l'inhibition de la voie Notch or l'expression de Numb est indispensable à l'endocytose des récepteurs Notch pour l'activation de la voie de signalisation (McGill, Dho et al. 2009). Dans ce contexte, il est possible que la protéine Numb soit exprimée dans les deux cellules filles avec une étroite régulation de ses fonctions en relation avec l'endocytose, l'inhibition de la voie Notch et le complexe de polarité Par3-Par6-aPKC. Or CRMP2, a été montré comme important dans la polarité neuronale en relation avec le complexe Par3-Par6-aPKC. CRMP5 pourrait être au centre de la régulation de Numb dans la cellule où la voie Notch sera activée et destinée à l'autorenouvellement. Au-delà de toutes les régulations de Numb déjà décrites et mettant en jeu une régulation de l'expression de la protéine ou des modifications post-traductionnelles, l'expression de CRMP5 au cours de la division asymétrique des cellules souches de glioblastome pourrait inhiber, de manière asymétrique, l'action inhibitrice de Numb sur la voie Notch, en accord avec nos résultats, et promouvoir l'autorenouvellement d'une des deux cellules fille.

Ce rôle de CRMP5 suggère soit une localisation asymétrique de la protéine, soit une régulation asymétrique de son interaction avec Numb. Par homologie avec les autres CRMP, nous pouvons supposer que CRMP5 peut-être phosphorylée par la GSK-3 β . L'activité asymétrique de cette kinase pourrait donc résulter en un rôle différent de CRMP5 dans chacune des cellules filles soit dans le remodelage du cytosquelette soit dans l'activation de la voie Notch. Pour renforcer cette hypothèse, l'inhibition de GSK-3 β a résulté en l'activation de l'autorenouvellement dans un modèle de cellules souches embryonnaires (Kirby, Schott et al. 2012). De plus, l'activation de cette kinase a résulté en la différenciation de ces mêmes cellules (Monteiro, Wdziekonski et al. 2009). Pris ensemble, ces données suggèrent que si l'activation de GSK-3 β est asymétrique alors elle serait reliée à l'engagement vers la différenciation d'une des cellules filles. Pour aller plus loin dans cette hypothèse, il est intéressant d'observer les protéines régulatrices de GSK-3 β , Akt et le complexe de polarité Par3-Par6-aPKC. Au

cours du mécanisme de polarité neuronale, l'activation d'Akt résulte en l'inhibition de de GSK-3 β (Jiang, Guo et al. 2005). L'activation d'Akt dans des cellules souches neurales a promu leur autorenouvellement, détecté par une augmentation de la prolifération avec le maintien de l'expression du marqueur de cellules souche Nestine (Guo, Zhao et al. 2013). De plus, l'inactivation de l'inhibiteur d'Akt, PTEN dans des cellules souche neurales a induit leur autorenouvellement, ce mécanisme étant impliqué dans la gliomagenèse (processus de transformation tumorale des cellules souches neurales) (Zheng, Ying et al. 2008). Ces deux résultats mis en perspective par rapport à la GSK-3 β , suggèrent que l'activation asymétrique d'Akt induit l'autorenouvellement d'une des deux cellules fille au cours de la division asymétrique, cet effet mettra en jeu l'inhibition de la GSK-3 β . D'autre part, un autre régulateur de GSK-3 β est le complexe de polarité Par3-Par6-aPKc dont l'activation résulte en l'inhibition de cette kinase (Jiang, Guo et al. 2005). De manière intéressante, ce complexe contrôle la localisation de Numb au cours de la division asymétrique dans un modèle drosophile (Wirtz-Peitz, Nishimura et al. 2008). Dans les cellules souches neurales, Par3 est localisée de manière asymétrique pour promouvoir l'autorenouvellement de la cellule fille. La voie de signalisation Notch a été montrée activée dans les cellules contenant Par3 suggérant que l'activation de cette voie impliquée dans l'autorenouvellement des cellules souches de glioblastome, est dépendante de la présence du complexe de polarité. Dans ce système l'expression de Numb a été montrée indispensable à l'établissement de la division asymétrique par l'activation de la voie Notch au niveau de la cellule en autorenouvellement mais également dans la cellule engagée dans la différenciation (Bultje, Castaneda-Castellanos et al. 2009).

L'ensemble de ces données permettent de proposer un mécanisme impliquant CRMP5, Numb et Notch dans la division asymétrique des cellules souches de glioblastome. **Dans la cellule fille destinée à l'autorenouvellement**, le complexe de polarité contenant Par3 induit l'activation de la voie Notch qui elle-même active Akt. La protéine Numb intervient dans l'internalisation des récepteurs Notch activés puis serait phosphorylée par le complexe de polarité induisant son relargage dans le cytoplasme. Il est important de noter que l'activation d'Akt et du complexe de polarité résulte en l'inhibition de la GSK-3 β , ce qui suggère la présence de la forme non-phosphorylée de CRMP5 dans cette cellule. Considérant que CRMP5 participe à l'activation de la voie Notch par son interaction avec Numb, on peut émettre l'hypothèse que CRMP5 promeut l'autorenouvellement des cellules souches neurales et peut être tumorales en participant à l'activation de la voie Notch par l'inhibition de Numb. Dans ce cas l'interaction CRMP5/Numb nécessiterait une forme de CRMP5 non-phosphorylée et une forme de Numb phosphorylée par le complexe de polarité ou AAK1. **Dans la cellule fille destinée à la différenciation**, l'absence du complexe de polarité résultera en une inactivation de la voie Notch par la dégradation des récepteurs dépendante de Numb. Akt ne sera plus activée et ne jouera pas son rôle

d'inhibiteur de GSK-3 β , ce qui suggère la présence d'une forme phosphorylée de CRMP5 n'ayant pas de rôle à jouer dans l'inhibition de l'action de Numb sur Notch. Cette forme peut être impliquée dans les mouvements du centrosome en partenariat avec Numb comme cela a été décrit chez la drosophile.

Ces hypothèses appuyées par la bibliographie, suggèrent une fonction versatile de CRMP5 dans la division asymétrique des cellules souches de glioblastome, d'une part, dans la cellule destinée à l'autorenouvellement, CRMP5 dans une forme non-phosphorylée, permettrait l'activation de la voie Notch par inhibition de la dégradation des récepteurs dépendante de Numb. D'autre part, dans la cellule destinée à la différenciation, CRMP5 dans une forme phosphorylée, n'aurait plus d'action dans l'activation de la voie Notch résultant en la dégradation des récepteurs dépendante de Numb. Le rôle de cette forme phosphorylée reste à élucider mais nous pouvons supposer un rôle dans le remodelage du cytosquelette ou le trafic intracellulaire en relation avec Numb pour assurer des mouvements asymétriques du centrosome.

De nombreuses zones d'ombres persistent pour comprendre le rôle de CRMP5 dans la division asymétrique. L'étude de l'effet de la phosphorylation de CRMP5 sur les fonctions qui lui sont associées (polarité neuronale, prolifération, activation de la voie Notch) permettra d'avancer vers la compréhension du mécanisme de fonctionnement de la protéine. De plus, même si CRMP5 peut exister sous-forme de monomères, il sera intéressant d'évaluer le rôle des dimères et tétramères de la protéine avec d'autres CRMP dans ces fonctions cellulaires.

Figure 30 : CRMP5 protège les récepteurs Notch de la dégradation induite par Numb et Itch résultant en l'activation constitutive de la voie de signalisation, l'augmentation de l'activation d'Akt et une forte prolifération des cellules tumorales. Ces événements sont reliés à une plus faible survie des patients, introduisant l'expression CRMP5 comme un facteur de mauvais pronostic dans les glioblastomes

CONCLUSIONS

The aim of my thesis was to define the role of CRMP5 in proliferation of a brain tumor, glioblastoma. CRMP5 expression is largely expressed at the protein level in the GBM tumor, GBM primary cultures, cell lines and GBM-derived-stem cells-enriched cultures. We demonstrated a new function for CRMP5, GBM proliferation involving Notch pathway CRMP5-dependent activation. From a mechanistic point of view, we have shown that CRMP5 post-translationally regulates, Notch receptors stability by inhibiting their Itch E3 ubiquitin ligase dependent degradation. Precisely, CRMP5 action was defined by its interaction with Numb, responsible for the degradation of Notch receptors as known in physiological conditions. CRMP5 abolishes the interaction between Numb and Notch receptors, resulting in a constitutive activation of the signaling pathway and proliferation in glioblastoma cells. Concomitantly, a translation study conducted by Dr D. Meyronet showed that CRMP5 protein is an indicator of low survival in a cohort study of 183 patients. Targeting the interaction Notch/Numb interaction may be an attractive approach for the treatment of this highly aggressive tumor.

These results provide a new function for CRMP5 in the glioblastoma proliferation by the Notch signaling pathway. The interaction between Numb and CRMP5 could be new mechanism for regulating the Notch signaling pathway in pathological conditions and raises many questions about the role of CRMP5 in tumor formation on the one hand and the development of the nervous system in the other hand. These points will be discussed in the following chapters to offer a wider role for CRMP5 as a moonlighting protein.

I- CRMP5: a new regulator of the Notch signaling pathway in glioblastomas

1° A new function for CRMP5 in glioblastoma proliferation

CRMP5 expression in a tumoral context has been previously studied by our team in small cell lung neuroendocrine carcinoma (Meyronet, Massoma et al. 2008). In glioblastoma, a transcriptomic study on 20 tumors identified CRMP5 as a marker of poor survival and associated with a cluster of genes related to proliferation (Liang, Diehn et al. 2005). We confirmed CRMP5 expression at the protein level in several glioblastoma models, cell lines, stem cells, xenograft and human GBM from patients. Cytosolic and nuclear CRMP5 localization was detected similar to lung tumors (Meyronet, Massoma et al. 2008) and another publication from the laboratory in glioblastomas (Brot, Malleval et al. 2013). By cell fractionation, we showed nuclear, membrane, cytoplasmic and cytoskeleton CRMP5 localisation in two glioblastoma cell lines. Several forms of CRMP5 were identified, membrane and cytoplasmic fractions contained two bands for CRMP5 at 66kDa and 62kDa. The 62kDa band

corresponds to the theoretical CRMP5 molecular weight whereas the 66kDa band could be a post-translationally modified phosphorylated CRMP5 which could be expressed only in these two compartments (cytoplasmic and cytoskeleton). In our work, the 66kDa form was detectable on fresh extracts denatured immediately after cell fractionation (fractionation was performed in absence of phosphatase inhibitors), while in a second western blot after thawing of the samples, the band at 66kDa was gone, reinforcing the idea that it's a phosphorylated form of CRMP5. The 64kDa band detected in the nuclear fraction may correspond to a different phosphorylation of CRMP5 which could induce a conformational change to expose a nuclear localization site at the protein surface (phosphorylation sites are located in the unstructured C-terminal domain). This band was also lost in a second analysis of the same samples reinforcing the idea of the phosphorylation for nuclear translocation. It is surprising to see that the form of CRMP5 associated with the cytoskeleton is a shorter form (58kDa) than the entire protein (62 kDa) because there is no splice variant described for CRMP5 (Inatome, Tsujimura et al. 2000), it is possible that this band corresponds to the product of CRMP5 cleavage by Calpain (Jiang, Kappler et al. 2007). If association with microtubules depends on Calpain cleavage, using a Calpain inhibitor may result in the loss of CRMP5 localization in the cytoskeleton and of its interaction with tubulin.

This cellular fractionation experiment provide substantial new information on the regulation of CRMP5 sub-cellular localization as strong phosphorylation (band at 66kDa) of the protein is associated with cytoplasmic or membrane localization while a different phosphorylation (64kDa band) will promote its nuclear translocation. These phosphorylated forms of could be characteristic of the tumor model like it was shown for CRMP2 where T555 phosphorylation only found in tumor cells and associated with proliferation (Tahimic, Tomimatsu et al. 2006). Phosphorylation sites described for CRMP5 are the residues T509, T514, T516 and S534, by homology with CRMP2, a single phosphorylation site is homologous between these two proteins, the T509 (equivalent to T514 of CRMP2). Phosphorylation of a tyrosine residue has been identified for CRMP5 (Inatome, Tsujimura et al. 2000). By homology with CRMP2 phosphorylation of residue Y479 by Src kinase, the equivalent amino acid Y472 on CRMP5 must be phosphorylated because the region is highly conserved between all CRMP isoforms. CRMP5 nuclear localization signal (NLS) is available in dimeric or monomeric CRMP5 conformation according to published structure (Brot, Mallevat et al. 2013). Indeed, in those structures CRMP5 C-terminal domain is located at the opposite of the NLS but does not seem available in the tetrameric conformation maybe because it would be covered by the C-terminal domain of another CRMP5 subunit. These data suggest that the regulation of CRMP5 nuclear localization is done on its C-terminal domain, which is intrinsically non-structured, by a post-translational modification that could induce a conformational change sufficient for NLS exposure. Considering regulation of CRMP5 nuclear

localization by phosphorylation, structural changes of the protein according to the phosphorylation status of four phosphorylated residues described (T509, T514, T516 and S534) were studied based on amino acids by an aspartate residue which mimics a phosphorylation of a serine or threonine residue and structural changes prediction. If the amino acid replacement (mimicking phosphorylation) induces a profound conformational change (unstructured area changed to structured area or vice versa) this will suggest an opening in the shape of CRMP5 C-terminal domain which could result in NLS exposure. Using structure prediction by four different methods (based on homology or statistics), CRMP5 C-terminal fragment contains one α -helical structure between residues R526 and S531, other areas are in random coil (unstructured). Individual phosphorylation at sites T509, T514, T516 and S534 do not cause a predicted structural change. Double phosphorylation (mimicked by an aspartate residue) of T509 and T516 site resulted in a conformational change of the α -helix pattern to an unstructured domain suggesting a flexibility increase which may be involved in NLS exposure. Other combinations of two phosphorylated sites didn't resulted in a conformational change while mutation of T509, T514 and T516 sites in aspartate residue induced a predicted, completely unstructured CRMP5 C-terminal domain. Finally, if the four phosphorylation sites are mutated (threonine to aspartate), the conformational change is abolished. These predicted data suggest that phosphorylation of T509 (conserved phosphorylation site of GSK-3 β) with the T516 phosphorylation site is key to the opening of CRMP5 conformation to allow NLS exposure. The S534 residue may be regulator site because its phosphorylation (mimicked by an aspartate) abolished the conformational change. GSK-3 β activity seems important in the mechanism of CRMP5 nuclear translocation but has never been linked to Notch pathway activation. The contribution of nuclear CRMP5 to Notch signaling pathway activation remains an open question.

In glioblastoma, cytoskeleton-associated CRMP5 of lower molecular mass (58kDa) seems to be the product of a cleavage. The enzyme described in the cleavage of CRMP is Calpain (Jiang, Kappler et al. 2007; Zhang, Ottens et al. 2007). Short CRMP2 isoforms, probably derived from Calpain cleavage, are localized to the cytoskeleton and the nucleus (Bretin, Rogemond et al. 2006; Rogemond, Auger et al. 2008). The calpain-cleaved CRMP3 is also translocated into the nucleus (Kimura, Kudoh et al. 2011). The fact that the CRMP5 nuclear form isn't the short form, resulting of a cleavage, could be a characteristic of this protein compared to other family members. The characterization of the function associated to this cleavage in the interaction with tubulin and with the other CRMP, will advance the understanding of the role of CRMP tetramers in cytoskeletal remodeling and migration. The results of CRMP5 subcellular localization in glioblastomas are different from those previously published. We show a cytosolic localization (66kDa), membrane (66kDa), nuclear (64kDa) and cytoskeleton (58kDa) of CRMP5 in glioblastoma cells while the nuclear CRMP5 was described a short isoform (58kDa) (Brot,

Malleval et al. 2013). These differences are certainly due to a difference in lot of anti-CRMP5 used (variability between batches of antibody purification), furthermore in this study, the CRMP5 cytoskeletal association was not evaluated.

Two CRMP5 expression patterns have been identified in human glioblastomas and connected to patients survival to confirm the results of the previously published transcriptomic study (Liang, Diehn et al. 2005). The strong and consistent CRMP5 expression is correlated with a lower survival. From these data, it is interesting to determine whether CRMP5 expression could be related to a subgroup of glioblastoma described in the molecular classification (Verhaak, Hoadley et al. 2010). We had access to transcriptomic standardized expression results (TCGA) to evaluate CRMP5 mRNA expression. CRMP5 expression values are fairly homogeneous, the results suggest that CRMP5 expression could be associated with proneural and Classic subgroups while Neural and Mesenchymal subgroups are rather negative for CRMP5 expression (mRNA). The two CRMP5 expressing subgroups are described as less differentiated glioblastomas, with activation of signaling pathways involved in tumor stem cells maintenance (Verhaak, Hoadley et al. 2010). Furthermore, the Classic subgroup is characterized by the expression of the gene *nes* (Nestin), which is a target of the Notch pathway. Other Notch target genes, *hes 1*, *hey 1* and *notch 1* and *notch 2* receptors are expressed, suggesting that this pathway is very active in these tumors (Verhaak, Hoadley et al. 2010). To confirm these transcriptomic results, tissue microarray (TMA) were used to assess CRMP5 protein expression in a series of glioblastomas identified in the molecular classification (results not shown, David Meyronet). Results obtained with the TMA differ from those from transcriptomic data. In the 24 tumors analysed, strong or weak CRMP5 expression was detected in all molecular subtypes. These results suggest a strong regulatory of CRMP5 by post-translational modifications in glioblastomas, and thus reveal the limitations of transcriptomic analysis for the study of *dpysl5* gene expression (CRMP5).

The study of CRMP5 contribution in glioblastomas growth in vivo after tumor cells orthotopic injection in mice could not be completed because of CRMP5 shRNA cells limited stability. However, this result is very interesting to confirm the in vitro results presented in this thesis, but also to estimate the effectiveness of CRMP5 expression blockade on GBM growth in vivo. A viral approach to block the expression of CRMP5 could allow us to study the response of glioblastomas to various treatments depending on CRMP5 expression and go deeper into the understanding of tumorigenesis mechanisms.

In our cohort of 183 tumors, strongly CRMP5 expressing glioblastoma showed greater proliferation compared with CRMP5 low expressing glioblastomas, suggesting a new role for CRMP5 in proliferation. This function was confirmed in vitro in several glioblastoma cellular models (GL15 line and primary culture) where proliferation was shown dependent on CRMP5 expression by

the control of G1/S cell cycle phase transition and Cyclin D1 expression. These results provide information to another article describing neuroblastoma cells proliferation with a short nuclear CRMP5 fragment (residues 1-472) (Brot, Malleval et al. 2013). Our results of loss (siRNA) and gain (transfection) of CRMP5 in glioblastoma cells show an active role in proliferation for the total CRMP5 (62kDa) which was not assessed in this article. To complete the study of nuclear CRMP5 action in proliferation it will be necessary to use a full-length CRMP5 construct, mutated on its nuclear localization site. The previously used construct (cut by 92 C-terminal amino acid residues, 52kDa) does not reflect the reality of the short CRMP5 form (58kDa) whose composition and origin are not yet known.

The study of CRMP5 contribution in glioblastomas growth in vivo after tumor cells orthotopic injection in mice could not be completed because of CRMP5 shRNA cells limited stability. However, this result is very interesting to confirm the in vitro results presented in this thesis, but also to estimate the effectiveness of CRMP5 expression blockade on GBM growth in vivo. A viral approach to block the expression of CRMP5 could allow us to study the response of glioblastomas to various treatments depending on CRMP5 expression and go deeper into the understanding of tumorigenesis mechanisms.

2° Notch signaling pathway activation for proliferation is CRMP5-dependent

The Notch signaling pathway is very important in glioblastomas since its activation is linked to lower patient survival (Hulleman, Quarto et al. 2009), maintenance (Fan, Matsui et al. 2006), proliferation of cancer stem cells by the control of G1/S transition (Fan, Khaki et al. 2010) and the resistance of tumors to treatment (Zhu, Costello et al. 2011). We have shown that Notch pathway activation is dependent on CRMP5 expression in glioblastomas both at the target genes expression level and Notch receptors level *in vitro*. In human tumors, we demonstrated a very low expression of the Notch receptor in glioblastomas expressing low CRMP5. Similarly, the Hes 1 protein expression is much higher in glioblastomas expressing strongly CRMP5 compared to others. These results show that CRMP5 expression is connected to Notch pathway activation. Assessing the role of CRMP5 in downstream mechanisms of this pathway allows us to consider the extent of the role for CRMP5 in glioblastomas. The first target was the Akt protein whose activation is dependent on the Notch pathway in glioblastomas (Xu, Qiu et al. 2010; Zhang, Chen et al. 2012) and results in protecting cells against apoptosis by proliferation activation related to treatment resistance. We have shown that Akt activation by phosphorylation (S473) is also dependent on CRMP5 expression, we can assume that the observed effect on Akt is fully mediated by the modulation of CRMP5-dependant Notch signaling pathway. This effect was not found on Akt targets, mTor and p70S6K protein, suggesting that the Akt activation in GL15 cell line is independent of mTor and its targets. Although, in general Akt activation leads to the mTor activation, it has been shown that mTor inhibitors are effective only in a certain glioblastoma subtype with an activating mutation of the EGFR (EGFRvIII) concomitant with loss of the anti-oncogene PTEN (Gini, Zanca et al. 2013), showing that mTor is activated only in a certain subpopulation of glioblastomas. This population corresponds to the characteristics of glioblastoma subgroup Classic according to molecular classification (Verhaak, Hoadley et al. 2010). Notch pathway activation is involved in the resistance of cancer cells to apoptosis by expression of anti-apoptotic protein, Bcl-2. CRMP5 loss can therefore result in an increase of apoptosis due to the concomitant loss of the Notch pathway. GL15 cell line apoptosis was evaluated by TUNEL (Terminal deoxyNucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) and no change in apoptosis was observed under CRMP5 silencing (siRNA) compared to control indicating that the decrease in proliferation observed is actually due to a blockage of the cell cycle and not to an increase in apoptosis.

3° A role for CRMP5 in maintaining the stemness of glioblastoma stem cells?

Stem cells have been found in glioblastoma cells and characterized as resistant to current treatments (Singh, Clarke et al. 2004; Bao, Wu et al. 2006). The stem cell population is maintained within the tumor Notch signaling pathway that promotes their self-renewal (Shih and Holland 2006). Notch activation has been described in three stem cells specific functions, differentiation, proliferation and quiescence (Fan, Khaki et al. 2010). As shown in our results (Figure 20) CRMP5 is expressed in two stem cells in vitro models and is lost during differentiation as well as Notch 1 and Notch 2 receptors expression. This suggests that CRMP5 regulates Notch during the differentiation of these cells. The study of the regulation of CRMP5 expression will bring a new understanding of the mechanisms underlying glioblastoma stem cells differentiation. In a model of deficient mice for *dpysl5* gene (CRMP5), increased proliferation of neural stem cells and higher cell apoptosis in areas of adult neurogenesis (dentate gyrus) was observed (Veyrac, Reibel et al. 2011). Considering our results and the fact that a strong apoptosis of these cells was observed in KO mice CRMP5, this suggests that the Notch signaling pathway is not fully active in these cells to protect them from apoptosis. These data introduce a new role for CRMP5 with other signaling pathways such as Akt pathway in the maintenance of neural and tumoral stem cells. At the glioblastoma stem cell proliferation level, CRMP5 silencing (siRNA) in neurospheres derived from glioblastoma xenograft resulted in a strong proliferation decrease, showing that CRMP5 controls proliferation and self-renewal of these cells (data not shown). Notch pathway activation has not been studied in this experiment. Taken together, these results suggest that CRMP5 expression control maintenance and growth of the cancer stem cells population within glioblastoma contrary to what has been observed in adult neurogenesis areas.

The remaining question was whether the Notch pathway may also regulate CRMP5 expression to promote its own activation. Notch Inhibition by γ -secretase complex inhibitor did not affect CRMP5 expression levels or cleavage in GL15 cell line (data not shown), which shows a unilateral control of the Notch pathway by CRMP5. In the context of cancer stem cells, this suggests that regulation CRMP5 expression could be at the center of the commitment of these cells to proliferation, differentiation or quiescence.

4° CRMP5 controls Notch receptors stability by protection from degradation

Under CRMP5 blockade (siRNA), Notch 1 and Notch 2 receptors expression was lost while their mRNA expression wasn't impaired. This suggests a post-translational action of CRMP5 over Notch. We showed that Notch 1 and Notch 2 receptors are degraded in lysosomes under CRMP5 silencing (siRNA). In this experiment, treatment with proteasome or lysosome inhibitors did not result in Hes 1 restoration in western blot, showing, in agreement with the promoter activation and qPCR results, that the Hes 1 loss of expression is due to a loss of its promoter activation not to an increased degradation of the protein. The effects of CRMP5 loss of expression could be restored by inhibiting the expression of E3 ubiquitin ligase Itch responsible for Notch receptors degradation (Chastagner, Israel et al. 2008). These results show the precise role of CRMP5 in the Notch signaling pathway activation by hikacking Notch receptors from Itch.

II- CRMP5 : a new regulator of the Notch inhibitor, Numb

1° CRMP5 interfere in Numb dependent ubiquitination but not in endocytosis

Numb is the protein responsible for Notch receptors degradation by recruiting the E3 ubiquitin ligase Itch to promote their targeting to lysosomes (Figure 26). We have shown that Numb expression is independent of CRMP5 (Figure 25) and observed Numb expression in CRMP5 containing glioblastoma with an active Notch signaling pathway (Figure 25), suggesting that CRMP5 can control Numb inhibitor role on the Notch pathway. More specifically, we have shown that CRMP5 does not interfere with the Notch receptors internalization but could counter their Numb-dependent degradation (Figure 26). Furthermore, the Numb protein is relocalized to lysosomes in the absence of CRMP5 showing that the protein can assume its degradation function by recruiting the E3 ubiquitin ligase Itch involved in the degradation of Notch in the absence of CRMP5 (Figure 26). Given this assumption, it is possible that CRMP5 interfere with numb functions related to E3 ubiquitin ligases recruitment. Numb interacts with HDM2 to protect TP53 degradation (Colaluca, Tosoni et al. 2008), we showed that CRMP5 didn't interfere with this function since p53 is expressed in GL15 and A172 cells and CRMP5 loss of expression (siRNA) results in a concomitant p53 loss of expression (western blot). CRMP5 does not seem to inhibit the protective role of Numb in the p53 stabilization (data not shown). Numb can also induce Gli 1 transcription factor degradation by Itch (Di Marcotullio, Ferretti et al. 2006). Gli 1 loss of expression was observed by western blot on CRMP5 depleted GL15 cells (siRNA) (data not shown), showing that the role of CRMP5 lies beyond the Notch pathway and may interfere with the functions of Numb related to Itch recruitment. It is also possible that CRMP5 acts directly on Itch by interfering with the opening mechanism of the protein required for its activity (Di Marcotullio, Greco et al. 2011). This hypothesis remains to be tested.

The inhibition of Numb by CRMP5 is mediated by an interaction between the two proteins that we have shown by several techniques. The interaction domain of CRMP5 with Numb seems to be localized between amino-acids 244-472. The experiments performed do not allow us to conclude on the direct nature of this interaction. It would have required using purified proteins to be sure that there is no third partner between CRMP5 and Numb. However, GST-pull down shows that the two proteins are able to associate in vitro. Furthermore, proximity ligation assay technique, on GL15 cells shows that the two proteins are close to less than 30 nm, there is little room for a third protein partner at that distance. These results make strong enough the hypothesis whereby CRMP5 and Numb may interact directly. The interaction domain between CRMP5 and Numb is different from the interaction domain of CRMP5 with tubulin (Brot, Malleval et al. 2013) suggesting that these two protein interactions are not exclusive and that CRMP5 could play an adapter role in the Numb-dependent

intracellular trafficking. In addition, another member of the CRMP family, CRMP2, has been described for interacting with Numb in endocytosis of adhesion molecule L1 -CAM for axonal growth (Nishimura, Fukata et al. 2003).

2° Interaction between CRMP5 and Numb protects Notch receptors from Numb-induced degradation

Numb function is to inhibit the Notch signaling pathway through its interaction with the Notch receptor and the E3 ubiquitin ligase Itch. The interaction between Numb and CRMP5 dissociates the interaction between Numb and Notch, suggesting a role for CRMP5 in regulating the interaction of Numb with Notch. The study of the regulation of this interaction may lead to a better understanding of the mechanisms regulating the Notch signaling pathway and its downstream functions. Beyond the simple fact that the interaction between Numb and CRMP5 can be a competitive inhibitor of the interaction between Numb and Notch, it is possible that CRMP5 induce post- translational modification of the Numb protein. It will be interesting to check Numb phosphorylation status under loss or gain of CRMP5 as a first approach as Numb regulation by phosphorylation has been widely described (Sato, Watanabe et al. 2011). Another remaining hypothesis to test is that CRMP5 could inhibit the recruitment of E3 ubiquitin ligase Itch by Numb.

The role of CRMP5 compared to Numb and Notch pathway has been clarified in this thesis and allows an understanding of CRMP5 action, through its interaction with Numb, in protecting Notch receptor against Numb-induced degradation. Characterization of this interaction potentially opens on very interesting therapeutic targets for the treatment of glioblastomas. The dissociation of CRMP5/Numb interaction by a decoy peptide may result in Numb release and Notch receptor targeting into the lysosomal degradation resulting in loss of Notch and Sonic Hedgehog signaling pathways involved in proliferation, maintenance and self-renewal of glioblastoma stem cells. The specific interaction domain between the two proteins has been uncovered and shown on three domains of Numb involved in endocytosis. The use of blocking agent to abolish this interaction could strongly reduce the glioblastoma cells proliferation. One blocking peptides approach has been used effectively to block the interaction of CRMP2 with CaV2.2 (Calcium channel voltage-dependent) and chronic pain (Brittain, Duarte et al. 2011). In the case of glioblastoma, a peptide mimicking the interaction domain of Numb on CRMP5 could inhibit the interaction between these two proteins. CRMP5 would not be able to protect the Notch pathway to be inhibited by Numb in synergy with Itch. The resulting Notch and Sonic Hedgehog signaling pathways inhibition in glioblastoma stem cells could result in induction of differentiation due to loss of inhibition, by Notch target genes Hes 1 and Hey 1 proteins, of

differentiation factors expression. Differentiated cells can be eliminated by chemotherapy or radiotherapy approaches and the tumor should not rebound because the stem cell population would have been eliminated by blocking CRMP5/Numb interaction.

Model of CRMP5 action on Notch pathway activation in glioblastomas

Figure 29 : CRMP5 protects Notch receptors from Numb-induced degradation resulting in Numb leading to constitutive activation of the signaling pathway, increasing Akt activation and high tumor cell proliferation. These events are associated with lower patient survival, introducing CRMP5 expression as a poor prognostic factor in glioblastomas

Perspectives

I- CRMP5 : an actor of tumoral progression ?

1° CRMP5 and tumoral progression

The results obtained during my thesis introduces a new role for CRMP5 as a potential oncogene. CRMP5 expression in several cellular models results in an increase in Notch receptors expression and Notch target gene, *hes 1* expression. Notch pathway activation alone isn't sufficient to induce a high-grade tumor. A second oncogenic event must be present to potentiate Notch pathway overactivation and result in the malignant transformation of normal cells (Allen, Rodriguez et al. 2011; Natarajan, Li et al. 2013). CRMP5 expression has been shown in a glioblastoma population with an increased proliferation dependent of the Notch signaling pathway. It is unlikely that the CRMP5 expression alone could be sufficient to induce malignant transformation of a healthy cell considering the activation of the Notch pathway. It has been proposed that Notch receptors expression is linked to astrocytoma grade (brain tumor grade I to IV). The highest grades (III and IV) present a stronger expression of the Notch pathway components (Xu, Yu et al. 2009). CRMP5 expression may be required for the formation of a high-grade glioma to induce a strong Notch receptors expression leading to high activity of the signaling pathway. Another way to address the role of CRMP5 in tumorigenesis come from a study of the *Drosophila* CRMP homologue with Numb in centrosome movements during asymmetric division. Regulation of centrosome is an important step because deregulation may lead to genetic instability and promotes high-grade tumors formation. Abnormal centrosomes localization or excess of centrosomes have been described associated with glioblastoma (Loh, Lieu et al. 2010). CRMP and Numb expression in the two daughter cells during asymmetric division in *Drosophila*, result in an asymmetrical movement of the centrosome. CRMP expression in both cell during asymmetric division causes a delayed centrosome movement (Jauffred, Lense et al. 2013) which can lead to genetic instability. In CRMP5-depleted (siRNA) GL15 GBM cell line, many cells are multinucleated (personal observations), this shows abnormal mitosis, which may be due to deregulation of CRMP5-dependent centrosome movements. These errors during mitosis and asymmetric division due to CRMP5 expression may be part of the oncogenic events involved in glioblastoma formation.

In lung cancer context, CRMP5 is expressed only in the most aggressive of these tumors sub-type, small cell neuroendocrine carcinoma (Meyronet, Massoma et al. 2008). The Notch signaling pathway has been described in non-small cell lung carcinomas, so it is difficult to envisage a role for Notch with CRMP5 in this type of cancer. The study of Notch signaling pathway activation in tumors expressing CRMP5 will give further understanding whether the results we have obtained in glioblastoma may be applicable to other systems.

Taken together, these data suggest that in Neurofibromatosis type 1, high production of type 1 Neuregulin and cAMP could permanently induce CRMP5 expression in Schwann cells. CRMP5 in turn will activate the Notch signaling pathway resulting in Schwann cells de-differentiation and their malignant transformation. This model seems interesting to study CRMP5 oncogenic potential.

One last interesting model to consider the role of CRMP5 in the formation of tumors are the Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors (MPNST, WHO grade III) derived from Schwann cells. CRMP5 is expressed in Schwann cells (Camdessanche, Feraud et al. 2012). Expression in these cells is regulated by two extracellular factors cAMP and type 1 neuregulin which are both capable of inducing CRMP5 expression (Camdessanche, Feraud et al. 2012). During mechanisms of nerve regeneration, CRMP5 expression is increased in Schwann cells in response to these two factors. Furthermore, these events have been shown associated with a dedifferentiation phenomenon of these cells (Camdessanche, Feraud et al. 2012). This step also involves the activation of the Notch signaling pathway in Schwann cells (Woodhoo, Alonso et al. 2009). These data suggest a synergy between the CRMP5 expression and Notch activation and in the regeneration of nerve sheaths. Interestingly, Notch 1 activation by transduction of the intracellular domain in Schwann cells resulted in their dedifferentiation and malignant transformation. The in vivo implantation of transformed cells has led to tumors formation, identified as MPNST, showing that in this model, Notch pathway activation alone is capable of inducing a high grade cancer (Li, Rao et al. 2004). Neurofibromatosis is a genetic disease resulting from loss of function mutations in the NF1 anti-oncogene. This disease is characterized by constant tumors formation as schwannomas (WHO grade I), optic gliomas (WHO grade II) and MPNST (WHO grade III) (Friedman 1999). Schwann cells from NF1 mutated patients highly express type 1 neuregulin (Kazmi, Byer et al. 2013) with an aberrant cAMP metabolism (Dang and De Vries 2011). These two factors have been described to induce the formation of MPNST because the transgenic mice overexpressing type 1 Neuregulin is a model of this type of tumor (Kazmi, Byer et al. 2013). Taken together, these data suggest that in Neurofibromatosis type 1, high production of type 1 Neuregulin and cAMP could permanently induce CRMP5 expression in Schwann cells. CRMP5 in turn will activate the Notch signaling pathway resulting in Schwann cells de-differentiation and their malignant transformation. This model seems interesting to study CRMP5 oncogenic potential.

2° CRMP5, a new player in glioblastoma stem cells asymmetric division

Glioblastoma are resistant to treatment because of a cancer stem cells population responsible for rebound after treatment. Asymmetric division of these cells is a major event in the maintenance of the population. The endocytic matrix has been proposed as a dynamic view of the mechanisms involved in asymmetric division for commitment to differentiation of one of the two daughter cells (Pece, Confalonieri et al. 2011). This function is directly dependent of Notch signaling pathway inhibition by the cell fate determinant Numb (Spana and Doe 1996). Regulating Numb is an important point in the decision to commitment of one of the two cells during asymmetric division. Numb asymmetric localization has been widely described in *Drosophila* and Mammals and linked to Notch pathway inhibition but Numb expression is also essential for Notch receptors endocytosis which is an essential for pathway activation (McGill, Dho et al. 2009). In this context, it is possible that the Numb protein is expressed in both daughter cells with a tight regulation of its functions in relation to endocytosis, inhibition of the Notch pathway and the polarity complex Par3-Par6-aPKC. CRMP2 has been shown to be important in neuronal polarity in relation to the Par3- Par6-aPKC complex (Yoshimura et al., 2006). CRMP5 could be central to the regulation of Numb in the cell where the Notch pathway is activated and committed to self-renewal. Beyond all numb regulations already described and involving regulation of protein expression or post- translational modifications, CRMP5 expression during asymmetric division of glioblastoma stem cells could inhibit, asymmetrically, the inhibitory effect of Numb on Notch pathway, in agreement with our results (Figure 28), and promote self-renewal of one of the two daughter cells.

This suggests an asymmetric localization of CRMP5 or an asymmetric regulation of its interaction with Numb. By homology with other CRMP, we can assume that CRMP5 can be phosphorylated by GSK- β . The asymmetric activity of this kinase could therefore result in a different function for CRMP5 in each daughter cell in cytoskeleton remodeling or in Notch pathway activation. To reinforce this hypothesis, GSK- β inhibition resulted in the activation of self-renewal in a model of embryonic stem cells (Kirby, Schott et al. 2012). In addition, activation of this kinase resulted in the differentiation of these cells (Monteiro, Wdziekonski et al. 2009). Taken together, these data suggest that if GSK- β activation is asymmetrical then it would be connected to the commitment to differentiation of the daughter cells. To go further in this case, it is interesting to observe GSK- β regulatory proteins, Akt and the polarity complex Par3- Par6-aPKC. In the mechanism of neuronal polarity, Akt activation results in GSK- β inhibition (Jiang, Guo et al. 2005). Akt activation in neural stem cells promoted their self-renewal, as detected by an increase in proliferation with the

maintenance of the expression of the stem cell marker, Nestin (Guo, Zhao et al. 2013). In addition, PTEN (Akt inhibitor) inactivation in neural stem cells induced their self-renewal, this mechanism is involved in gliomagenesis (process of neural stem cells malignant transformation) (Zheng, Ying et al. 2008). Both results put into perspective in relation to GSK-3 β , suggest that the asymmetric activation of Akt induce self-renewal of one of the two daughter cells during asymmetric division by GSK-3 β inhibition. On the other hand, another regulator of GSK-3 β is the polarity complex Par3-Par6-aPKC whose activation results in inhibition of this kinase (Jiang, Guo et al. 2005). Interestingly, this complex controls Numb localization during asymmetric division in the *Drosophila* model (Wirtz-Peitz, Nishimura et al. 2008). In neural stem cells, Par3 is localized asymmetrically to promote self-renewal of the daughter cell. The Notch signaling pathway has been shown activated in cells containing Par3 suggesting that activation of this pathway, involved in self-renewal of glioblastoma stem cells, is dependent on the presence of the polarity complex. In this system, Numb expression has been shown essential for the establishment of asymmetric division by its action in activating the Notch pathway at the self-renewing daughter cell but also by inhibiting Notch only in the cell committed to differentiation (Bultje, Castaneda-Castellanos et al. 2009).

All these data allow us to propose a mechanism involving CRMP5, Numb and Notch in the asymmetric division of glioblastoma stem cells. **In the daughter cell committed to self-renewal**, the polarity complex containing Par3 induces Notch pathway activation which activates Akt. Numb protein is involved in activated Notch receptor internalization and can be phosphorylated by the polarity complex inducing its release into the cytoplasm. It is important to note that Akt activation and polarity complex results in GSK-3 β inhibition, suggesting the presence of a non-phosphorylated form of CRMP5 in this cell. CRMP5 participates in Notch signaling pathway activation through its interaction with Numb, we can hypothesize that CRMP5 promotes glioblastoma stem cells self-renewal by participating in Notch pathway activation by inhibiting Numb. In this case the CRMP5/Numb interaction could require a non-phosphorylated form of CRMP5 and phosphorylated form of Numb derived from the polarity complex or AAK1 activity. **In the daughter cell committed to differentiation**, lack of polarity complex will result in Notch pathway inactivation by Numb-dependent Notch receptors degradation. Akt will not be activated and will not play its inhibitory role of GSK-3 β , suggesting the presence of a phosphorylated form of CRMP5 having no role in inhibiting of the action of Numb on Notch. This form may be involved in centrosome movement in partnership with Numb as it has been described in *Drosophila*.

These hypotheses supported by the literature, suggest a versatile function for CRMP5 in glioblastoma stem cells asymmetric division, on the one hand, in the self-renewing cell, CRMP5 in a non-phosphorylated form, would activate the Notch pathway by inhibiting Numb. On the other hand,

in the differentiating cell, a phosphorylated CRMP5 form, would no longer act in Notch pathway activation resulting in Numb dependent Notch receptors degradation. The function of phosphorylated CRMP5 remains unclear but we can assume a role in cytoskeleton remodeling and intracellular trafficking in connection with Numb to ensure asymmetric movements of the centrosome.

Many areas remain unclear to understand the function of CRMP5 in glioblastoma asymmetric division. Studying of the effect of phosphorylation on CRMP5 functions (neuronal polarity, proliferation, activation of the Notch pathway) will move forward the understanding of CRMP5 functions and regulations. Moreover, even if CRMP5 may exist as a monomer, it will be interesting to assess the role of dimers and tetramers of the protein with other CRMP in these cellular functions.

Model of CRMP5 action in glioblastoma stem cells asymmetric division

Figure 30 : Glioblastoma stem asymmetric division regulation by CRMP5 activating Notch signaling pathway by its interaction with Numb in the self renewing cell. CRMP5 could be phosphorylated in the differentiating cell a play an unknow function.

Matériels et méthodes

1° Création d'outils de biologie moléculaire pour l'analyse de la fonction de protéines

a) Clonage de promoteur

L'analyse de l'activation d'une voie de signalisation peut être faite en quantifiant par qRT-PCR le taux de transcription des gènes cibles de cette voie et par mesure de l'activité des promoteurs de ces gènes. Dans ce cas, un fragment de la séquence promotrice d'un gène est sous-clonée dans un plasmide en amont de la séquence codante de la luciférase, ainsi l'activité de la luciférase sera directement reliée à l'activation du promoteur.

Pour quantifier l'activation de la voie de signalisation Notch, il est nécessaire de réaliser des plasmides contenant les séquences des promoteurs des gènes cibles de cette voie. Un fragment réduit de ce promoteur est utilisé arbitrairement, défini entre les bases à -2000pb jusqu'à +100pb par rapport au site d'initiation de la transcription de ces gènes. Les séquences des ARNm de deux gènes cibles de la voie Notch ont été récupérées sur Genbank, *hes1* (NM_005524.3) qui est le gène cible de la voie Notch le plus référencé et régulièrement utilisé pour mesurer l'activation de la voie et le gène *hey1* (NM_012258.3) dont l'expression a été reliée à une plus faible survie dans les glioblastomes. En utilisant la séquence de l'ARNm comme site d'initiation de la transcription la séquence ADN située sur les chromosomes portant les gènes d'intérêt est récupérée entre -2000pb et +100pb par rapport au site d'initiation de la transcription. Le gène *hes1* est situé sur le brin non transcrit du chromosome 3 (3q28-q29), la séquence d'intérêt est située entre les paires de bases 1003470077 et 100349177. Le gène *hey1* est situé sur le brin transcrit du chromosome 8 (8q21), la séquence d'intérêt située entre les paires de bases 32544399 et 32546499. Les séquences promotrices sont analysées avec le logiciel Genomatix pour vérifier la présence des séquences consensus du facteur de transcription RBPj_κ. Pour les deux promoteurs, ces séquences consensus sont situées entre -600pb et +100pb par rapport au site d'initiation de la transcription. Des amorces sont synthétisées (Eurofins) pour amplifier les séquences promotrices des gènes *hes1* et *hey1* (tableau 1), ces amorces serviront également pour la recombinaison des séquences amplifiées dans le plasmide pGL4-18 au site de restriction Nhe1 (non-conservé après recombinaison). Ce plasmide contient la séquence codante de la Firefly luciférase. Ainsi, l'activité enzymatique totale de la luciférase est directement reliée à l'activité du promoteur amplifié.

La polymérase HD advantage (Clontech) est utilisée selon le protocole du constructeur. Le produit de PCR est migré dans un gel d'agarose 1%, une lecture aux UV permet d'identifier et de découper les bandes d'intérêt à 700pb. L'ADN correspondant à la séquence du promoteur amplifiée

est extrait avec le kit Gel Extraction (Macherey-Nagel) puis dosé. Le plasmide pGL4-18 est digéré par l'enzyme de restriction NheI puis extrait après migration sur gel.

La séquence du promoteur est insérée dans le plasmide par recombinaison selon le protocole du kit In-Fusion (Clontech). Brièvement, le plasmide pGL4-18 digéré est mis en contact avec le fragment de promoteur purifié avec un ratio de 1 :2, le mix d'enzyme de recombinaison est ajouté. La réaction est faite à 50°C pendant 15min. Le produit de recombinaison est transformé dans les bactéries DH5 α ultracompétentes, ensemencé sur boîte de pétri (LB agar, ampicilline 100 μ g.mL⁻¹). Les colonies obtenues sont analysées et les plasmides séquencés pour vérifier la présence et l'intégrité du promoteur inséré.

L'amplification des plasmides mutés est réalisée par transformation des bactéries ultracompétentes XL10-gold (Stratagène) avec le produit de digestion. Les bactéries sont mises en contact avec du β -mercaptoéthanol à 4% (v/v) puis laissées incuber pendant 10min à 4°C. Le produit de PCR a été ajouté à 4% (v/v), après incubation (30min, 4°C) afin que les sels d'ADN se forment à la surface des bactéries, un choc thermique a été réalisé (42°C, 30s) permettant de faire rentrer l'ADN dans les cellules, suivi d'une incubation (2min, 4°C). Du milieu SOC a été ajouté aux bactéries transformées qui ont ensuite été incubées à 37°C pendant 1h afin d'amorcer l'expression du gène de résistance. Des boîtes de pétri (LB, 20% agar m/v, ampicilline 50ng.mL⁻¹) ont été ensemencées avec les bactéries transformées et mises à 37°C sur une nuit afin de sélectionner les clones transformants.

b) Mutagénèse dirigée

Des plasmides pCAGGS contenant différentes constructions de Numb (Full, PTB et PRR) nous ont été généreusement donnés par le Dr K. Kaibuchi. Les constructions de Numb ont été sous-clonées aux sites de restriction EcoR1-Sal1 du plasmide pFlag-CMV₂ contenant le promoteur d'expression eucaryote CMV et le gène de résistance à l'ampicilline. Il a été nécessaire de réaliser une mutagénèse dirigée afin de mettre la séquence codante de Numb dans le même cadre de lecture que la séquence du Flag et insérer un codon stop à la fin de la séquence codante de PTB. Les amorces utilisées ont été élaborées en utilisant le logiciel de Stratagène (Tableau 1) et synthétisées par la société Eurofins. Elles sont complémentaires l'une de l'autre et contiennent la mutation en leur milieu afin que la perte d'énergie due aux mésappariements soit compensée par la bonne hybridation de part et d'autre du site à muter.

Selon le kit Quick Change II Site Directed Mutagenesis (Stratagène) le plasmide pFlag-CMV2-Numb est utilisé à une concentration de $170\text{pg}.\mu\text{L}^{-1}$, les amorces à $170\text{fmol}.\mu\text{L}^{-1}$ selon les instructions du kit. Les autres composants (dNTP, PfuUltra DNA polymerase, Quick sol reagent et tampon de réaction 10X) ont été fournis. L'amplification de l'ADN s'est faite en 18 cycles chacun composé d'une étape de dénaturation (95°C , 50s), d'une étape d'hybridation (60°C , 50s) et d'une étape d'élongation (68°C , 7min). Le produit de PCR a été soumis à une digestion enzymatique (Dpn1 ; $0,17\text{U}.\mu\text{L}^{-1}$, 37°C , 1H) pour éliminer le plasmide d'origine.

hes1	
infusion forward	ACCTGAGCTCGCTAGTTAGATGTGTCGGTAACTCACATTCTTAC
infusion reverse	TATCCTCGAGGCTAGGTGGCTACTTGGTGATCAGTAGCGCTGTTC
Hey1	
infusion forward	ACCTGAGCTCGCTAGCCATTCTTCTCCATTATGCGGAC
infusion reverse	TATCCTCGAGGCTAGACACTGATCCCGCTCACGCTTTGC

Tableau 1 : Amorces utilisées pour l'amplification des séquences promotrices des gènes hes1 et hey1. La séquence s'hybridant directement sur l'ADN génomique est indiquée en bleu et en rouge la séquence servant à la recombinaison dans le plasmide pGL4-18 au site Nhe1.

c) Amplification de plasmide

les bactéries transformées et mises à 37°C sur une nuit afin de sélectionner les clones transformants. La purification de plasmides a été réalisée sur colonne échangeuse d'ions selon le protocole établi par Macherey-Nagel (Kit Nucleobond plasmid DNA purification). Un clone bactérien unique a été prélevé pour ensemercer une préculture de milieu LB (Luria-Bertani, Ampicilline $100\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) mise à 37°C sur la nuit puis une culture ensemençée au $100^{\text{ème}}$ est incubée 16 h à 37°C . Les bactéries ont été récoltées par centrifugation 10 min à 8000g. Le culot bactérien est resuspendu dans le tampon RES, la lyse alcaline est réalisée (tampon LYS, 5min, température ambiante). La lyse est stoppée par neutralisation (tampon RES) provoquant la précipitation des protéines et du chromosome bactérien ainsi que la renaturation de l'ADN plasmidique. Le lysat filtré est passé sur une colonne échangeuse d'anions qui retient l'ADN plasmidique. L'élution faite (tampon ELU), la solution d'ADN obtenue est dosée par spectrophotométrie (mesure d'absorbance à 260nm).

La mutagenèse dirigée a été vérifiée par séquençage du plasmide (Beckman Coulter Genomics, England) et alignement des séquences obtenues avec la séquence théorique à l'aide du logiciel DS Visualiser (Accelrys).

2° Matériel cellulaire

Lignées cellulaires utilisées

La lignée cellulaire GL15 (décrite par bocchini *et al.*, 1991) est une lignée dérivée de glioblastome humain. Les cellules GL15 sont cultivées à 37° C, 5% CO₂ en DMEM, 1g.L⁻¹ glucose (Dulbecco's Modified Eagle Media ; Ref :21888 ;Invitrogen) 10% sérum de vœux fœtal (SVF)(v/v), 100µg/mL streptomycine. Les cellules sont trypsinées (trypsine+EDTA 0.25%) toutes les 72h et sont réensemencées au 1/10^{ème} dans du milieu de culture neuf. Trois lignées cellulaires ont été générées à partir de cellules GL15. Une lignée GL15 CRMP5 KD ayant intégré un plasmide codant un shRNA dirigé contre l'ARNm de CRMP5 pour inhiber l'expression de la protéine et deux lignées GL15 contrôles avec le plasmide vide ou un plasmide contenant un shRNA non spécifique. Les plasmides portent la séquence codante de la Red Fluorescent Protein (RFP) permettant le contrôle de la transfection. Ils contiennent également la séquence codante d'une protéine de résistance à la puromycine. De ce fait ces cellules sont cultivées en présence de puromycine (0.35µg/mL) afin de garder la pression de sélection.

3° Transfection de cellules

Transfection d'acides nucléiques

Cette technique utilise la lipofectamine 2000 (Invitrogen) comme lipofectant contenant des sous-unités amphiphiles qui peuvent former des micelles dans un environnement aqueux et piéger des acides nucléiques. Les micelles ainsi formées fusionnent avec la membrane plasmique des cellules vivantes et libère les acides nucléiques dans le cytoplasme. 50 000 cellules sont ensemencées sur des lamelles de verre stérilisées (dans des plaques 12 puits) préalablement recouvertes de Poly-L-lysine pendant 30 min à 37 C. Le lipofectant et l'ADN plasmidique sont dilués séparément dans un milieu sans sérum (Opti-MEM, Invitrogen) dans des proportions 1:2 (ADN en µg ; lipofectamine en µL). Après 5 minutes d'incubation, ces solutions sont mélangées et laissées à température ambiante pendant 20 minutes. La solution contenant les complexes de transfection est ensuite mise en contact avec les cellules adhérentes sans changement de milieu et incubé 6h à 37°C. L'ancien milieu de culture est enlevé et les cellules sont cultivées dans un nouveau milieu standard de culture pour les cellules GL15.

4° Analyse de l'expression et de la localisation de protéines ou ARNm

a) Lyse cellulaire et Western Blot

La technique de Western Blot permet l'analyse de protéines à partir d'un extrait cellulaire, par séparation selon leur masse moléculaire par électrophorèse. Les échantillons sont resuspendus dans du Tampon de lyse [10mM Tris-Hcl pH 7.4 ; NP40 1% (v/v) ; DOC 0.5% (v/v) ; SDS 0.1% (m/v) ; 1mM PMSF inhibiteur de protéases à sérines ; cocktails d'inhibiteurs de protéases Complete EDTA Free et Cocktail III protéase inhibitor Roche; 2mM NaO4 (orthovanadate de sodium) ; 1mM DTT; 250 U/mL Benzonaze]. Les protéines (20µg du lysat cellulaire) contenues dans les échantillons à analyser sont séparées selon leur masse moléculaire par SDS-PAGE. Deux marqueurs de poids moléculaires sont déposés, un coloré (Prestained Protein ladder plus #06p-0211 lot 00069135/10-221 ; Euromedex) et l'autre luminescent (Magicmark XP Western Protein Standard ; Invitrogen). Les échantillons sont préparés dans un tampon Laemmli 2X (Tris base 0.125M à pH 6.8 ; SDS2% ;glycérol 20% ;bleu de bromophénol 0.02% ; 10mM de DTT). Les protéines migrent dans le gel de concentration (acrylamide 5%) par l'utilisation de tampon de migration (Tris 0.025M pH8.3 ; Glycine 0.192M ; SDS 0.1% (m/v)) et sous un courant de tension égale à 100 Volts jusqu'à ce que les protéines migrent au niveau de limite des deux gels, puis à 200Volts pour la migration des protéines dans le gel de séparation. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (0.2µm ; perkinElmer Life science, Boston, MA) pendant 35 min à 500mA dans du tampon Transfert (Tris 25mM pH8.5 ; Glycine 192mM ; méthanol 20% (v/v)). Pour la caractérisation de ces protéines par immunomarquage, une saturation avec du Lait à 5% (dilué dans du TBS-T ; 150mM NaCl, 20mM Tris ; 0.1%Tween20) pendant 1heure est faite afin d'éliminer le plus possible tous les sites de fixation non spécifique des anticorps. Les membranes sont incubées avec l'anticorps primaire spécifique 1 heure à température ambiante dans du Lait 5%- TBS-T. 3 rinçage de 5 min avec du TBS-T permettent d'éliminer l'excédent d'anticorps fixé de manière non spécifique, suivi d'une incubation pendant 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à l'enzyme HRP (Horse RADish Peroxidase) et dirigé contre l'anticorps primaire, dans du lait 5% TBS-T. La révélation est faite par chimioluminescence (peroxydation du luminol, Milipore).

b) Fractionnement cellulaire

Le fractionnement cellulaire permet la séparation des protéines associées aux divers compartiments cellulaires. Des cellules GL15 ou A172 ont été récoltées et les fractions cytosolique, membranaire, nucléaire ou cytosquelette extraites selon le protocole du kit ProteoExtract Subcellular

Proteome Extraction Kit (Calbiochem). L'analyse sur xénogreffe de glioblastome a été réalisée à partir d'un échantillon cryopréservé. Les anticorps utilisés sont détaillés dans le tableau XXX.

c) Biotinylation de surface sur cellules transfectées

Dans le but d'analyser l'internalisation des récepteurs Notch en fonction de l'expression de CRMP5, des cellules GL15 ont été transfectées par un siRNA CRMP5 ou siRNA contrôle. Après 3 jours, les cellules sont incubées 30min sur glace puis rincées 2 fois avec du PBS froid (1mM MgCl₂, 0,1mM CaCl₂, 4°C). Les protéines membranaires sont biotinylées par incubation pendant 1 h à 4°C dans le tampon 154mM NaCl, 10mM HEPES pH 7,6, 3mM KCl, 1mM MgCl₂, 0,1mM CaCl₂, 10mM glucose et 0,8mM biotine. Les cellules sont rincées 2 fois avec PBS 100mM glycine puis avec du DMEM, 10% SVF froid et incubées à 21°C durant les temps indiqués. Les protéines à la surface de la cellule sont débiotinylées par incubation 2 fois 15min à 4°C dans le tampon 50mM glutathione (extemporanément), 75mM NaCl, 75mM NaOH et 1% SVF. Les molécules internalisées au cours de l'expérience sont biotinylées et peuvent être purifiées sur des billes de Streptavidine. Les cellules sont lysées avec 50mM HEPES pH 7,5, 150mM NaCl, 10% glycérol, 1,5mM MgCl₂, 1% Triton X-100, Complete protease inhibitor EDTA Free (Roche, 04 693 132 001), Protease Inhibitor Cocktail Set III, EDTA-Free (Calbiochem : 539134) et Benzonase (250U.mL⁻¹). 400µg de protéines totales sont incubées avec les billes de Streptavidine dans le tampon de lyse, la nuit à 4°C. Les billes sont ensuite rincées 3 fois dans, 50mM HEPES pH 7,5, 150mM NaCl, 10% glycérol, 1,5mM CaCl₂ et 1% NP40 puis dénaturées par la chaleur en conditions réductrices et analysées par western blot.

5° Méthodes de détection d'interaction protéine-protéine

a) Co-immunoprécipitation

La co-immunoprécipitation est une méthode de détection d'interaction protéine-protéine. Elle consiste à la précipitation, avec un anticorps spécifique, d'une protéine cible dite « appât » puis la détection des protéines dites « proies » ayant co-immunoprécipité, ceci permet de déterminer la composition de complexes protéiques à partir de matériel biologique vivant comme des cellules ou tissus.

Des cellules HEK préalablement transfectées et exprimant les protéines d'intérêt sont lysées dans le tampon d'immunoprécipitation (10mM Tris-HCl pH=7,4 ; 1% NP40 ; 0,1% SDS ; 0,5% DOC ; PBS) avec PMSF 1mM, Complete protease inhibitor (Roche), Cocktail III protease inhibitor 1/400

(Calbiochem), Orthovanadate de sodium 2mM, Sodium fluoride 10mM, Sodium pyrophosphate 2mM, Sodium β -glycérophosphate 2mM, 1mM DTT, Benzonase 250U.mL⁻¹ (Merck) ajoutés extemporanément. La lyse est effectuée 10min à 4°C puis la concentration en protéines totales des échantillons est dosée par le kit BCA (Pierce).

Le lysat cellulaire (500 μ g) est incubé avec 5 μ g d'anticorps spécifique ou un anticorps contrôle non relevant mais provenant de la même espèce et appartenant au même isotype. Les solutions préparées sont incubées à 4°C sur la nuit sous agitation douce pour permettre la complexation de l'anticorps avec les protéines cibles.

Les billes protein G sepharose (GE healthcare) sont préparées selon le protocole du fabricant, brièvement, 100 μ L de billes par condition sont prélevés et rincés à l'eau stérile, les billes sont ensuite équilibrées dans le tampon d'immunoprécipitation décrit précédemment. le surnageant des billes éliminé, les solutions de lysat cellulaires avec anticorps sont ajoutées sur les billes puis mises à incuber 1H à 4°C, durant cette étape le fragment Fc de l'anticorps est retenu par la protéine G à la surface des billes, les partenaires protéiques de la cible de l'anticorps sont donc également retenus à la surface de billes. Plusieurs lavages sont effectués (6x5 min) avec le tampon d'immunoprécipitation puis les billes sont resuspendues dans du tampon Laemmli avec DTT et chauffées à 95°C pendant 5min pour dénaturer les protéines présentes avec les billes. L'analyse par western blot des échantillons permettra de déterminer les partenaires présents au sein d'un complexe protéique.

b) GST-Pull Down

Le GST-Pull down est une technique de détection d'interaction protéine-protéine in vitro. La première étape consiste à la surproduction en système bactérien des protéines recombinantes d'intérêt fusionnées à la GST (Gluthation S transférase).

Les plasmides pGEX-6P-1 contenant les différents fragments de CRMP5 (Obtenus de Brot et al., 2010) sont transformés dans les bactéries E. coli souche BL21 (DE3). Un clone unique est piqué pour ensemercer une préculture (LB, 100ng.mL⁻¹ ampicilline) mise à 37°C pendant 16H sous agitation. Une culture (LB, 100ng.mL⁻¹ ampicilline) est ensemencée au 1/1000 à partir de la préculture puis laissée à 37°C sous agitation jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 0,6. L'induction de la surproduction de la protéine est faite à 400 μ M IPTG pendant 4H à 37°C sous agitation. La culture est centrifugée à 8000g pendant 10min à 4°C puis le culot bactérien obtenu est conservé à -80°C.

Le culot est resuspendu dans un tampon 20mM Tris-HCl pH=8.0, 20% glycérol, 0,1% Triton X-100, 1mM PMSF, 1mM DTT, Complete protease inhibitor EDTA Free (Roche), Protease Inhibitor Cocktail Set III, EDTA-Free (Calbiochem), 1mg.mL⁻¹ Lysozyme, 250U.mL⁻¹ Benzonase puis lysé sur glace par sonication (5 pulses de 7 secondes avec 1min de pause entre chaque pulse). Le lysat obtenu est centrifugé à 12000g pendant 20min à 4°C pour éliminer les débris membranaires ; le surnageant est récupéré, aliquoté et conservé à -80°C.

Il est nécessaire d'utiliser la même quantité de protéines recombinantes dans chaque essai pour pouvoir analyser l'intensité relative des bandes obtenues lors de l'analyse du GST-pull down par western blot. L'activité enzymatique d'une solution est directement reliée à la concentration d'enzyme dans cette solution pour une concentration de substrat saturante.

Selon l'équation de Michaelis-Menten, la vitesse de conjugaison enzymatique ne dépend que de la concentration initiale en enzyme donc de la quantité d'enzyme (ici la Glutathion S transférase) dans la solution. Le dosage des activités enzymatiques dans chaque lysat bactérien contenant les constructions de CRMP5 fusionnées à la GST permettra de normaliser les essais de GST-pull down par l'utilisation dans chaque essai de la même activité enzymatique GST donc de la même quantité de protéine recombinante.

Le dosage de l'activité GST est fait selon le protocole Habig et al., 1974. La conjugaison du glutathion réduit avec le 1-Chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) est catalysée par la GST, le suivi de la formation du produit de la réaction se fait par mesure de la DO_{340nm}.

Un tampon phosphate 0.1M, pH=6.5 est utilisé pour la réaction et constitue le blanc de DO. 0.1mM de glutathion et de CDBN sont ajoutés et la DO suivie jusqu'à stabilisation, correspondant à la vitesse de conjugaison non enzymatique. Le lysat bactérien est ajouté au 1/200 dans la solution de réaction puis la DO suivie sur 180s. La mesure du coefficient directeur de la pente associée à la vitesse initiale de la réaction enzymatique, donne la valeur d'activité enzymatique en $\Delta DO.s^{-1}$ dans l'échantillon testé. Les valeurs obtenues entre les divers échantillons sont comparées et le GST-pull down sera normalisé selon la valeur d'activité enzymatique la plus faible.

Les billes glutathion-sepharose (GE healthcare) sont préparées selon le protocole du constructeur, brièvement, 150µL de billes 20% éthanol par condition sont prélevés et transférés dans un tube 1,5mL stérile. De l'éthanol pur est ajouté jusqu'à 50% final puis les billes centrifugées et le surnageant éliminé. De l'eau stérile est ajoutée pour le rinçage des billes, après centrifugation et

élimination du surnageant, les billes sont équilibrées dans le tampon de GST-pull down (20mM, tris-HCl pH=7.4, 20% glycérol, 0.1% Triton X-100).

La même quantité d'activité GST donc de protéines recombinantes issues des lysats bactériens est ajoutée sur les billes équilibrées dans le tampon de GST-pull down puis laissées incuber 3h à 4°C sous agitation douce pour permettre la l'adsorption des protéines recombinantes fusionnées GST sur le glutathion à la surface des billes. Les billes sont rincées 6 fois 5 min à 4°C avec le tampon de GST pull down pour éliminer les protéines d'origine bactérienne fixées de manière non spécifique. 500µg de protéines totales issues des lysats de cellules HEK transfectées sont mises à incuber, à 4°C sur la nuit sous agitation douce, avec les billes glutathion sepharose adsorbées avec les protéines recombinantes fusionnées GST. Pour éliminer les interactions non spécifiques, 6 lavages de 5 min à 4°C sont effectués avec le tampon de GST pull down. Le surnageant éliminé, les billes sont resuspendues dans 100µL tampon Laemmli (conditions réductrices) puis les protéines retenues sur les billes sont dénaturées par la chaleur 5 min à 95°C. L'analyse par western blot permettra des déterminer les protéines retenues par chaque construction et de conclure sur les interactions protéine-protéine étudiées.

c) Détermination d'un domaine d'interaction protéique par puce à peptide

Des puces à peptides ont été générées par Intavis (Celluspot). Les peptides présents sur la puce représentent la totalité de la séquence de CRMP5 par fragments de 15 résidus d'acides aminés avec un décalage de 6 résidus entre chaque peptide.

Pour réaliser l'expérience, des cellules HEK ont été transfectées par le CRMP5-Flag et lysées après 24 dans le tampon 10mM Tris-HCl, pH=7,4, 50mM NaCl, 10% glycérol et 0.1% Triton X-100 en présence d'inhibiteurs de phosphatase de d'inhibiteurs de protéases. Les protéines ont été mises en contact avec la puce, préalablement saturée par 5% BSA, TBS-T, pendant 3h à température ambiante sous agitation douce puis la puce a été lavée 3 fois avec le tampon de lyse. La révélation a été faite de la même manière qu'un western blot. Brièvement, l'anticorps anti-Flag a été incubé pendant 1h à température ambiante puis rincé et l'anticorps secondaire anti-souris ajouté pendant 1h à température ambiante. La révélation a été faite par peroxydation du luminol (Millipore). Les intensités de signal sur chaque peptides a été quantifiées sur Image J.

6° Etude des fonctions cellulaires

Test de la prolifération de cellules transfectées

Cette technique utilise les propriétés du BrdU (5Bromo-2'-deoxyuridine), nucléotide synthétique analogue de la Thymidine, de s'incorporer à l'ADN nouvellement synthétisé dans les cellules en cours de réplication (pendant la phase S du cycle cellulaire). Les différentes lignées sont ensemencées sur des lamelles de verre stérilisées et incubées, 24h après ensemencement, avec du BrdU (25µg/mL) pendant 2h puis fixées. La fixation se fait avec du Paraformaldehyde 4% (dilué dans du Tampon Phosphate 0.1M pH7.4) pendant 20min à température ambiante. Il est nécessaire de démasquer les échantillons pour exposer les sites antigéniques où l'anticorps viendra se fixer. Cette étape est faite avec de l'HCL 2N pendant 20min à température ambiante. L'acide est éliminé suivi d'une étape de neutralisation par un tampon de tetraborate de sodium à 0.1 M pendant 10 min à température ambiante. Trois rinçages au PBS de 5 min sont fait avant une étape de perméabilisation avec du PBS-BSA1% (m/v) ; Triton-X100 0.3%(v/v) pendant 1h à température ambiante. L'anticorps primaire anti BrdU est ensuite incubé dans du PBS, 1% BSA (m/v) pendant 1h à température ambiante. Après 3 Rinçages de 5 min, l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome est ajouté, dans une incubation d'1 h à l'abri de la lumière à température ambiante. Ensuite le noyau est marqué avec du 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (236270 ; Roche, 0.5µg/mL dans du PBS) qui se lie fortement aux régions AT de l'ADN, pendant 10 min suivi de 3 rinçages de 5 min au PBS. Les lamelles sont fixées dans du fluoprep (Biomérieux) et l'observation se fait à l'aide d'un microscope Zeiss à EPI fluorescence. Le rapport du nombre de cellules marquées au BrdU sur le nombre de cellules marquées au DAPI est un indice de prolifération. 10 champs sont comptés par conditions.

Bibliographie

- Ahimou, F., L. P. Mok, et al. (2004). "The adhesion force of Notch with Delta and the rate of Notch signaling." *J Cell Biol* **167**(6): 1217-1229.
- Alabed, Y. Z., M. Pool, et al. (2010). "GSK3 beta regulates myelin-dependent axon outgrowth inhibition through CRMP4." *J Neurosci* **30**(16): 5635-5643.
- Allen, T. D., E. M. Rodriguez, et al. (2011). "Activated Notch1 induces lung adenomas in mice and cooperates with Myc in the generation of lung adenocarcinoma." *Cancer Res* **71**(18): 6010-6018.
- Arimappamagan, A., K. Somasundaram, et al. (2013). "A fourteen gene GBM prognostic signature identifies association of immune response pathway and mesenchymal subtype with high risk group." *PLoS One* **8**(4): e62042.
- Arimura, N., A. Hattori, et al. (2009). "CRMP-2 directly binds to cytoplasmic dynein and interferes with its activity." *J Neurochem* **111**(2): 380-390.
- Arimura, N. and K. Kaibuchi (2007). "Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms." *Nat Rev Neurosci* **8**(3): 194-205.
- Aylsworth, A., S. X. Jiang, et al. (2009). "Characterization of the role of full-length CRMP3 and its calpain-cleaved product in inhibiting microtubule polymerization and neurite outgrowth." *Exp Cell Res* **315**(16): 2856-2868.
- Bachmann, E., T. N. Krogh, et al. (1996). "Mouse fetal antigen 1 (mFA1), the circulating gene product of mdlk, pref-1 and SCP-1: isolation, characterization and biology." *J Reprod Fertil* **107**(2): 279-285.
- Bao, S., Q. Wu, et al. (2006). "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response." *Nature* **444**(7120): 756-760.
- Barolo, S., R. G. Walker, et al. (2000). "A notch-independent activity of suppressor of hairless is required for normal mechanoreceptor physiology." *Cell* **103**(6): 957-969.
- Berdnik, D., T. Torok, et al. (2002). "The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in Drosophila." *Dev Cell* **3**(2): 221-231.
- Beres, B. J., R. George, et al. (2011). "Numb regulates Notch1, but not Notch3, during myogenesis." *Mech Dev* **128**(5-6): 247-257.
- Bizzoca, A., P. Corsi, et al. (2012). "F3/Contactin acts as a modulator of neurogenesis during cerebral cortex development." *Dev Biol* **365**(1): 133-151.
- Blaumueller, C. M., H. Qi, et al. (1997). "Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane." *Cell* **90**(2): 281-291.
- Bozkulak, E. C. and G. Weinmaster (2009). "Selective use of ADAM10 and ADAM17 in activation of Notch1 signaling." *Mol Cell Biol* **29**(21): 5679-5695.
- Bray, S. J. (2006). "Notch signalling: a simple pathway becomes complex." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(9): 678-689.
- Brescia, P., B. Ortensi, et al. (2013). "CD133 is essential for glioblastoma stem cell maintenance." *Stem Cells* **31**(5): 857-869.
- Bretin, S., V. Rogemond, et al. (2006). "Calpain product of WT-CRMP2 reduces the amount of surface NR2B NMDA receptor subunit." *J Neurochem* **98**(4): 1252-1265.
- Brittain, J. M., D. B. Duarte, et al. (2011). "Suppression of inflammatory and neuropathic pain by uncoupling CRMP-2 from the presynaptic Ca(2)(+) channel complex." *Nat Med* **17**(7): 822-829.
- Brittain, J. M., Y. Wang, et al. (2012). "Cdk5-mediated phosphorylation of CRMP-2 enhances its interaction with Cav2.2." *FEBS Lett* **586**(21): 3813-3818.
- Brot, S., C. Malleval, et al. (2013). "Identification of a new CRMP5 isoform present in the nucleus of cancer cells and enhancing their proliferation." *Exp Cell Res* **319**(5): 588-599.
- Brot, S., V. Rogemond, et al. (2010). "CRMP5 interacts with tubulin to inhibit neurite outgrowth, thereby modulating the function of CRMP2." *J Neurosci* **30**(32): 10639-10654.
- Brou, C., F. Logeat, et al. (2000). "A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE." *Mol Cell* **5**(2): 207-216.

- Buel, G. R., J. Rush, et al. (2010). "Fyn promotes phosphorylation of collapsin response mediator protein 1 at tyrosine 504, a novel, isoform-specific regulatory site." *J Cell Biochem* **111**(1): 20-28.
- Bultje, R. S., D. R. Castaneda-Castellanos, et al. (2009). "Mammalian Par3 regulates progenitor cell asymmetric division via notch signaling in the developing neocortex." *Neuron* **63**(2): 189-202.
- Byk, T., T. Dobransky, et al. (1996). "Identification and molecular characterization of Unc-33-like phosphoprotein (Ulip), a putative mammalian homolog of the axonal guidance-associated unc-33 gene product." *J Neurosci* **16**(2): 688-701.
- Byk, T., S. Ozon, et al. (1998). "The Ulip family phosphoproteins--common and specific properties." *Eur J Biochem* **254**(1): 14-24.
- Cain, R. J. and A. J. Ridley (2009). "Phosphoinositide 3-kinases in cell migration." *Biol Cell* **101**(1): 13-29.
- Camdessanche, J. P., K. Ferraud, et al. (2012). "The collapsin response mediator protein 5 onconeural protein is expressed in Schwann cells under axonal signals and regulates axon-Schwann cell interactions." *J Neuropathol Exp Neurol* **71**(4): 298-311.
- Chadborn, N. H., A. I. Ahmed, et al. (2006). "PTEN couples Sema3A signalling to growth cone collapse." *J Cell Sci* **119**(Pt 5): 951-957.
- Charrier, E., S. Reibel, et al. (2003). "Collapsin response mediator proteins (CRMPs): involvement in nervous system development and adult neurodegenerative disorders." *Mol Neurobiol* **28**(1): 51-64.
- Chastagner, P., A. Israel, et al. (2008). "AIP4/Itch regulates Notch receptor degradation in the absence of ligand." *PLoS One* **3**(7): e2735.
- Chen, H., A. Thiagalingam, et al. (1997). "Conservation of the Drosophila lateral inhibition pathway in human lung cancer: a hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10): 5355-5360.
- Chen, J., Y. Li, et al. (2012). "A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy." *Nature* **488**(7412): 522-526.
- Chen, J., J. Xu, et al. (2005). "Characterization of human LNX, a novel ligand of Numb protein X that is downregulated in human gliomas." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(11): 2273-2283.
- Chen, T. C., S. A. Lee, et al. (2009). "From midbody protein-protein interaction network construction to novel regulators in cytokinesis." *J Proteome Res* **8**(11): 4943-4953.
- Chi, Z., J. Zhang, et al. (2012). "Botch promotes neurogenesis by antagonizing Notch." *Dev Cell* **22**(4): 707-720.
- Clarke, M. F. and M. Fuller (2006). "Stem cells and cancer: two faces of eve." *Cell* **124**(6): 1111-1115.
- Colaluca, I. N., D. Tosoni, et al. (2008). "NUMB controls p53 tumour suppressor activity." *Nature* **451**(7174): 76-80.
- Compostella, A., A. Tosoni, et al. (2007). "Prognostic factors for anaplastic astrocytomas." *J Neurooncol* **81**(3): 295-303.
- Cordle, J., S. Johnson, et al. (2008). "A conserved face of the Jagged/Serrate DSL domain is involved in Notch trans-activation and cis-inhibition." *Nat Struct Mol Biol* **15**(8): 849-857.
- Cotton, M., N. Benhra, et al. (2013). "Numb inhibits the recycling of Sanpodo in Drosophila sensory organ precursor." *Curr Biol* **23**(7): 581-587.
- Couturier, L., K. Mazouni, et al. (2013). "Numb localizes at endosomes and controls the endosomal sorting of notch after asymmetric division in Drosophila." *Curr Biol* **23**(7): 588-593.
- Cui, X. Y., Q. D. Hu, et al. (2004). "NB-3/Notch1 pathway via Deltex1 promotes neural progenitor cell differentiation into oligodendrocytes." *J Biol Chem* **279**(24): 25858-25865.
- Dalerba, P., R. W. Cho, et al. (2007). "Cancer stem cells: models and concepts." *Annu Rev Med* **58**: 267-284.
- Dang, I. and G. H. De Vries (2011). "Aberrant cAMP metabolism in NF1 malignant peripheral nerve sheath tumor cells." *Neurochem Res* **36**(9): 1697-1705.
- Das, D., F. Lanner, et al. (2010). "Notch induces cyclin-D1-dependent proliferation during a specific temporal window of neural differentiation in ES cells." *Dev Biol* **348**(2): 153-166.

- De Strooper, B., W. Annaert, et al. (1999). "A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain." *Nature* **398**(6727): 518-522.
- Deo, R. C., E. F. Schmidt, et al. (2004). "Structural bases for CRMP function in plexin-dependent semaphorin3A signaling." *EMBO J* **23**(1): 9-22.
- Dhami, G. K., H. Liu, et al. (2013). "Dynamic methylation of Numb by Set8 regulates its binding to p53 and apoptosis." *Mol Cell* **50**(4): 565-576.
- Di Marcotullio, L., E. Ferretti, et al. (2006). "Numb is a suppressor of Hedgehog signalling and targets Gli1 for Itch-dependent ubiquitination." *Nat Cell Biol* **8**(12): 1415-1423.
- Di Marcotullio, L., A. Greco, et al. (2011). "Numb activates the E3 ligase Itch to control Gli1 function through a novel degradation signal." *Oncogene* **30**(1): 65-76.
- Dustrude, E. T., S. M. Wilson, et al. (2013). "CRMP2 Protein SUMOylation Modulates Nav1.7 Channel Trafficking." *J Biol Chem* **288**(34): 24316-24331.
- Eiraku, M., A. Tohgo, et al. (2005). "DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development." *Nat Neurosci* **8**(7): 873-880.
- El Hindy, N., K. Keyvani, et al. (2013). "Implications of Dll4-Notch signaling activation in primary glioblastoma multiforme." *Neuro Oncol*.
- Ellisen, L. W., J. Bird, et al. (1991). "TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms." *Cell* **66**(4): 649-661.
- Euskirchen, P., K. O. Skaftnesmo, et al. (2011). "NUMB does not impair growth and differentiation status of experimental gliomas." *Exp Cell Res* **317**(20): 2864-2873.
- Facchino, S., M. Abdouh, et al. (2010). "BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery." *J Neurosci* **30**(30): 10096-10111.
- Fan, X., L. Khaki, et al. (2010). "NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts." *Stem Cells* **28**(1): 5-16.
- Fan, X., W. Matsui, et al. (2006). "Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors." *Cancer Res* **66**(15): 7445-7452.
- Fernandez-Valdivia, R., H. Takeuchi, et al. (2011). "Regulation of mammalian Notch signaling and embryonic development by the protein O-glucosyltransferase Rumi." *Development* **138**(10): 1925-1934.
- Ferreira, A. C., G. Suriano, et al. (2012). "E-cadherin impairment increases cell survival through Notch-dependent upregulation of Bcl-2." *Hum Mol Genet* **21**(2): 334-343.
- Fisher, A. L., S. Ohsako, et al. (1996). "The WRPW motif of the hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain." *Mol Cell Biol* **16**(6): 2670-2677.
- Fiuza, U. M., T. Klein, et al. (2010). "Mechanisms of ligand-mediated inhibition in Notch signaling activity in Drosophila." *Dev Dyn* **239**(3): 798-805.
- Flavahan, W. A., Q. Wu, et al. (2013). "Brain tumor initiating cells adapt to restricted nutrition through preferential glucose uptake." *Nat Neurosci*.
- Fomchenko, E. I. and E. C. Holland (2005). "Stem cells and brain cancer." *Exp Cell Res* **306**(2): 323-329.
- Friedman, J. M. (1999). "Epidemiology of neurofibromatosis type 1." *Am J Med Genet* **89**(1): 1-6.
- Frise, E., J. A. Knoblich, et al. (1996). "The Drosophila Numb protein inhibits signaling of the Notch receptor during cell-cell interaction in sensory organ lineage." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11925-11932.
- Fryer, C. J., J. B. White, et al. (2004). "Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover." *Mol Cell* **16**(4): 509-520.
- Fu, J. R., W. L. Liu, et al. (2006). "Sonic hedgehog protein promotes bone marrow-derived endothelial progenitor cell proliferation, migration and VEGF production via PI 3-kinase/Akt signaling pathways." *Acta Pharmacol Sin* **27**(6): 685-693.
- Fukada, M., I. Watakabe, et al. (2000). "Molecular characterization of CRMP5, a novel member of the collapsin response mediator protein family." *J Biol Chem* **275**(48): 37957-37965.

- Fukata, Y., T. J. Itoh, et al. (2002). "CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly." *Nat Cell Biol* **4**(8): 583-591.
- Gao, X., J. Pang, et al. (2010). "Expression profiling identifies new function of collapsin response mediator protein 4 as a metastasis-suppressor in prostate cancer." *Oncogene* **29**(32): 4555-4566.
- Gini, B., C. Zanca, et al. (2013). "The mTOR Kinase Inhibitors, CC214-1 and CC214-2, Preferentially Block the Growth of EGFRvIII-Activated Glioblastomas." *Clin Cancer Res* **19**(20): 5722-5732.
- Gordon, W. R., D. Vardar-Ulu, et al. (2009). "Effects of S1 cleavage on the structure, surface export, and signaling activity of human Notch1 and Notch2." *PLoS One* **4**(8): e6613.
- Goshima, Y., F. Nakamura, et al. (1995). "Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33." *Nature* **376**(6540): 509-514.
- Gu, Y. and Y. Ihara (2000). "Evidence that collapsin response mediator protein-2 is involved in the dynamics of microtubules." *J Biol Chem* **275**(24): 17917-17920.
- Guo, H., Z. Zhao, et al. (2013). "An activated protein C analog stimulates neuronal production by human neural progenitor cells via a PAR1-PAR3-S1PR1-Akt pathway." *J Neurosci* **33**(14): 6181-6190.
- Gupta-Rossi, N., S. Ortica, et al. (2011). "The adaptor-associated kinase 1, AAK1, is a positive regulator of the Notch pathway." *J Biol Chem* **286**(21): 18720-18730.
- Gupta-Rossi, N., E. Six, et al. (2004). "Monoubiquitination and endocytosis direct gamma-secretase cleavage of activated Notch receptor." *J Cell Biol* **166**(1): 73-83.
- Habib, S. J., B. C. Chen, et al. (2013). "A localized Wnt signal orients asymmetric stem cell division in vitro." *Science* **339**(6126): 1445-1448.
- Hamaguchi, Y., N. Matsunami, et al. (1989). "Purification and characterization of a protein that binds to the recombination signal sequence of the immunoglobulin J kappa segment." *Nucleic Acids Res* **17**(22): 9015-9026.
- Hamajima, N., K. Matsuda, et al. (1996). "A novel gene family defined by human dihydropyrimidinase and three related proteins with differential tissue distribution." *Gene* **180**(1-2): 157-163.
- Hambleton, S., N. V. Valeyev, et al. (2004). "Structural and functional properties of the human notch-1 ligand binding region." *Structure* **12**(12): 2173-2183.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Hiroshima, Y., F. Nakamura, et al. (2012). "Collapsin Response Mediator Protein 4 Expression is Associated with Liver Metastasis and Poor Survival in Pancreatic Cancer." *Ann Surg Oncol*.
- Hoeck, J. D., A. Jandke, et al. (2010). "Fbw7 controls neural stem cell differentiation and progenitor apoptosis via Notch and c-Jun." *Nat Neurosci* **13**(11): 1365-1372.
- Honnorat, J., J. C. Antoine, et al. (1996). "Antibodies to a subpopulation of glial cells and a 66 kDa developmental protein in patients with paraneoplastic neurological syndromes." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **61**(3): 270-278.
- Honnorat, J., T. Byk, et al. (1999). "Ulip/CRMP proteins are recognized by autoantibodies in paraneoplastic neurological syndromes." *Eur J Neurosci* **11**(12): 4226-4232.
- Horvath, C. A., D. Vanden Broeck, et al. (2007). "Epsin: inducing membrane curvature." *Int J Biochem Cell Biol* **39**(10): 1765-1770.
- Hotta, A., R. Inatome, et al. (2005). "Critical role of collapsin response mediator protein-associated molecule CRAM for filopodia and growth cone development in neurons." *Mol Biol Cell* **16**(1): 32-39.
- Hou, J., B. T. Tobe, et al. (2013). "Combined total proteomic and phosphoproteomic analysis of human pluripotent stem cells." *Methods Mol Biol* **1029**: 163-189.
- Hou, S. T., S. X. Jiang, et al. (2013). "Collapsin response mediator protein 3 deacetylates histone H4 to mediate nuclear condensation and neuronal death." *Sci Rep* **3**: 1350.
- Hou, S. T., S. X. Jiang, et al. (2006). "Calpain-cleaved collapsin response mediator protein-3 induces neuronal death after glutamate toxicity and cerebral ischemia." *J Neurosci* **26**(8): 2241-2249.

- Hu, Q. D., B. T. Ang, et al. (2003). "F3/contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation." *Cell* **115**(2): 163-175.
- Huenniger, K., A. Kramer, et al. (2010). "Notch1 signaling is mediated by importins alpha 3, 4, and 7." *Cell Mol Life Sci* **67**(18): 3187-3196.
- Hulleman, E., M. Quarto, et al. (2009). "A role for the transcription factor HEY1 in glioblastoma." *J Cell Mol Med* **13**(1): 136-146.
- Inagaki, N., K. Chihara, et al. (2001). "CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons." *Nat Neurosci* **4**(8): 781-782.
- Inatome, R., T. Tsujimura, et al. (2000). "Identification of CRAM, a novel unc-33 gene family protein that associates with CRMP3 and protein-tyrosine kinase(s) in the developing rat brain." *J Biol Chem* **275**(35): 27291-27302.
- Ingram, W. J., K. I. McCue, et al. (2008). "Sonic Hedgehog regulates Hes1 through a novel mechanism that is independent of canonical Notch pathway signalling." *Oncogene* **27**(10): 1489-1500.
- Irvine, K. D. and E. Wieschaus (1994). "fringe, a Boundary-specific signaling molecule, mediates interactions between dorsal and ventral cells during Drosophila wing development." *Cell* **79**(4): 595-606.
- Iso, T., V. Sartorelli, et al. (2001). "HERP, a novel heterodimer partner of HES/E(spl) in Notch signaling." *Mol Cell Biol* **21**(17): 6080-6089.
- Jauffred, B., F. Llense, et al. (2013). "Regulation of centrosome movements by numb and the collapsin response mediator protein during Drosophila sensory progenitor asymmetric division." *Development* **140**(13): 2657-2668.
- Jehn, B. M., I. Dittert, et al. (2002). "c-Cbl binding and ubiquitin-dependent lysosomal degradation of membrane-associated Notch1." *J Biol Chem* **277**(10): 8033-8040.
- Jiang, H., W. Guo, et al. (2005). "Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3beta and its upstream regulators." *Cell* **120**(1): 123-135.
- Jiang, S. X., J. Kappler, et al. (2007). "Calpain cleavage of collapsin response mediator proteins in ischemic mouse brain." *Eur J Neurosci* **26**(4): 801-809.
- Jiang, X., H. Xing, et al. (2012). "Numb regulates glioma stem cell fate and growth by altering epidermal growth factor receptor and Skp1-Cullin-F-box ubiquitin ligase activity." *Stem Cells* **30**(7): 1313-1326.
- Joo, K. M., S. Y. Kim, et al. (2008). "Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas." *Lab Invest* **88**(8): 808-815.
- Joutel, A., C. Corpechot, et al. (1996). "Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia." *Nature* **383**(6602): 707-710.
- Ju, W., Q. Li, et al. (2013). "SUMOylation alters CRMP2 regulation of calcium influx in sensory neurons." *Channels (Austin)* **7**(3): 153-159.
- Juven-Gershon, T., O. Shifman, et al. (1998). "The Mdm2 oncoprotein interacts with the cell fate regulator Numb." *Mol Cell Biol* **18**(7): 3974-3982.
- Kahlert, U. D., N. O. Bender, et al. (2012). "CD133/CD15 defines distinct cell subpopulations with differential in vitro clonogenic activity and stem cell-related gene expression profile in in vitro propagated glioblastoma multiforme-derived cell line with a PNET-like component." *Folia Neuropathol* **50**(4): 357-368.
- Kang, S. A., J. H. Seol, et al. (2005). "The conserved WRPW motif of Hes6 mediates proteasomal degradation." *Biochem Biophys Res Commun* **332**(1): 33-36.
- Karaczyn, A., M. Bani-Yaghoub, et al. (2010). "Two novel human NUMB isoforms provide a potential link between development and cancer." *Neural Dev* **5**: 31.
- Kathagen, A., A. Schulte, et al. (2013). "Hypoxia and oxygenation induce a metabolic switch between pentose phosphate pathway and glycolysis in glioma stem-like cells." *Acta Neuropathol*.
- Kazmi, S. J., S. J. Byer, et al. (2013). "Transgenic mice overexpressing neuregulin-1 model neurofibroma-malignant peripheral nerve sheath tumor progression and implicate specific chromosomal copy number variations in tumorigenesis." *Am J Pathol* **182**(3): 646-667.

- Kimura, J., T. Kudoh, et al. (2011). "Identification of dihydropyrimidinase-related protein 4 as a novel target of the p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage." Int J Cancer **128**(7): 1524-1531.
- Kimura, T., H. Watanabe, et al. (2005). "Tubulin and CRMP-2 complex is transported via Kinesin-1." J Neurochem **93**(6): 1371-1382.
- Kirby, L. A., J. T. Schott, et al. (2012). "Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) inhibitor, SB-216763, promotes pluripotency in mouse embryonic stem cells." PLoS One **7**(6): e39329.
- Kleihues, P. and L. H. Sobin (2000). "World Health Organization classification of tumors." Cancer **88**(12): 2887.
- Krejci, A. and S. Bray (2007). "Notch activation stimulates transient and selective binding of Su(H)/CSL to target enhancers." Genes Dev **21**(11): 1322-1327.
- Krivtsov, A. V., F. N. Rozov, et al. (2007). "Jedi--a novel transmembrane protein expressed in early hematopoietic cells." J Cell Biochem **101**(3): 767-784.
- Kwon, C., P. Cheng, et al. (2011). "Notch post-translationally regulates beta-catenin protein in stem and progenitor cells." Nat Cell Biol **13**(10): 1244-1251.
- Lagadec, C., E. Vlashi, et al. (2012). "Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells." Stem Cells **30**(5): 833-844.
- Lathia, J. D., J. Gallagher, et al. (2011). "Direct in vivo evidence for tumor propagation by glioblastoma cancer stem cells." PLoS One **6**(9): e24807.
- Lathia, J. D., M. Hitomi, et al. (2011). "Distribution of CD133 reveals glioma stem cells self-renew through symmetric and asymmetric cell divisions." Cell Death Dis **2**: e200.
- Lee, S. F., B. Srinivasan, et al. (2011). "Gamma-secretase-regulated proteolysis of the Notch receptor by mitochondrial intermediate peptidase." J Biol Chem **286**(31): 27447-27453.
- Li, J. L., R. C. Sainson, et al. (2011). "DLL4-Notch signaling mediates tumor resistance to anti-VEGF therapy in vivo." Cancer Res **71**(18): 6073-6083.
- Li, J. L., R. C. Sainson, et al. (2007). "Delta-like 4 Notch ligand regulates tumor angiogenesis, improves tumor vascular function, and promotes tumor growth in vivo." Cancer Res **67**(23): 11244-11253.
- Li, Y., M. A. Hibbs, et al. (2012). "Genome-wide analysis of N1ICD/RBPJ targets in vivo reveals direct transcriptional regulation of Wnt, SHH, and hippo pathway effectors by Notch1." Stem Cells **30**(4): 741-752.
- Li, Y., P. K. Rao, et al. (2004). "Notch and Schwann cell transformation." Oncogene **23**(5): 1146-1152.
- Liang, Y., M. Diehn, et al. (2005). "Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(16): 5814-5819.
- Lin, H., W. Xiong, et al. (2011). "Notch-1 activation-dependent p53 restoration contributes to resveratrol-induced apoptosis in glioblastoma cells." Oncol Rep **26**(4): 925-930.
- Ling, H. and P. Jolicœur (2013). "Notch-1 signaling promotes the cyclinD1-dependent generation of mammary tumor-initiating cells that can revert to bi-potential progenitors from which they arise." Oncogene **32**(29): 3410-3419.
- Lino, M. M. and A. Merlo (2011). "PI3Kinase signaling in glioblastoma." J Neurooncol **103**(3): 417-427.
- Liu, L., F. Lanner, et al. (2011). "Numlike and Numb differentially affect p53 and Sonic Hedgehog signaling." Biochem Biophys Res Commun **413**(3): 426-431.
- Liu, X. H., Y. Wu, et al. (2013). "Androgens up-regulate transcription of the Notch inhibitor Numb in C2C12 myoblasts via Wnt/beta-catenin signaling to T cell factor elements in the Numb promoter." J Biol Chem **288**(25): 17990-17998.
- Liu, Y. P., C. J. Yang, et al. (2013). "Cisplatin selects for multidrug-resistant CD133+ cells in lung adenocarcinoma by activating Notch signaling." Cancer Res **73**(1): 406-416.
- Logeat, F., C. Bessia, et al. (1998). "The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 8108-8112.
- Loh, J. K., A. S. Lieu, et al. (2010). "Differential expression of centrosomal proteins at different stages of human glioma." BMC Cancer **10**: 268.

- Louis, D. N., H. Ohgaki, et al. (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." Acta Neuropathol **114**(2): 97-109.
- Lu, K. V., J. P. Chang, et al. (2012). "VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex." Cancer Cell **22**(1): 21-35.
- Majava, V., N. Loytynoja, et al. (2008). "Crystal and solution structure, stability and post-translational modifications of collapsin response mediator protein 2." FEBS J **275**(18): 4583-4596.
- Masamizu, Y., T. Ohtsuka, et al. (2006). "Real-time imaging of the somite segmentation clock: revelation of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(5): 1313-1318.
- Matsumoto, A., I. Onoyama, et al. (2011). "Fbxw7-dependent degradation of Notch is required for control of "stemness" and neuronal-glial differentiation in neural stem cells." J Biol Chem **286**(15): 13754-13764.
- McGill, M. A., S. E. Dho, et al. (2009). "Numb regulates post-endocytic trafficking and degradation of Notch1." J Biol Chem **284**(39): 26427-26438.
- McGill, M. A. and C. J. McGlade (2003). "Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain." J Biol Chem **278**(25): 23196-23203.
- Meurette, O., S. Stylianou, et al. (2009). "Notch activation induces Akt signaling via an autocrine loop to prevent apoptosis in breast epithelial cells." Cancer Res **69**(12): 5015-5022.
- Meyronet, D., P. Massoma, et al. (2008). "Extensive expression of collapsin response mediator protein 5 (CRMP5) is a specific marker of high-grade lung neuroendocrine carcinoma." Am J Surg Pathol **32**(11): 1699-1708.
- Minturn, J. E., H. J. Fryer, et al. (1995). "TOAD-64, a gene expressed early in neuronal differentiation in the rat, is related to unc-33, a C. elegans gene involved in axon outgrowth." J Neurosci **15**(10): 6757-6766.
- Mitsui, N., R. Inatome, et al. (2002). "Involvement of Fes/Fps tyrosine kinase in semaphorin3A signaling." EMBO J **21**(13): 3274-3285.
- Miyamoto, A., R. Lau, et al. (2006). "Microfibrillar proteins MAGP-1 and MAGP-2 induce Notch1 extracellular domain dissociation and receptor activation." J Biol Chem **281**(15): 10089-10097.
- Mizugaki, H., J. Sakakibara-Konishi, et al. (2012). "gamma-Secretase inhibitor enhances antitumour effect of radiation in Notch-expressing lung cancer." Br J Cancer **106**(12): 1953-1959.
- Molina, H., D. M. Horn, et al. (2007). "Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(7): 2199-2204.
- Moloney, D. J., L. H. Shair, et al. (2000). "Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules." J Biol Chem **275**(13): 9604-9611.
- Monteiro, M. C., B. Wdziekonski, et al. (2009). "Commitment of mouse embryonic stem cells to the adipocyte lineage requires retinoic acid receptor beta and active GSK3." Stem Cells Dev **18**(3): 457-463.
- Moretti, J., P. Chastagner, et al. (2010). "The translation initiation factor 3f (eIF3f) exhibits a deubiquitinase activity regulating Notch activation." PLoS Biol **8**(11): e1000545.
- Moretti, J., P. Chastagner, et al. (2012). "The ubiquitin-specific protease 12 (USP12) is a negative regulator of notch signaling acting on notch receptor trafficking toward degradation." J Biol Chem **287**(35): 29429-29441.
- Morris, D. H., J. Dubnau, et al. (2012). "Divergent functions through alternative splicing: the Drosophila CRMP gene in pyrimidine metabolism, brain, and behavior." Genetics **191**(4): 1227-1238.
- Mukherjee, J., L. V. DeSouza, et al. (2009). "Loss of collapsin response mediator Protein1, as detected by iTRAQ analysis, promotes invasion of human gliomas expressing mutant EGFRvIII." Cancer Res **69**(22): 8545-8554.

- Mumm, J. S., E. H. Schroeter, et al. (2000). "A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1." *Mol Cell* **5**(2): 197-206.
- Musse, A. A., L. Meloty-Kapella, et al. (2012). "Notch ligand endocytosis: mechanistic basis of signaling activity." *Semin Cell Dev Biol* **23**(4): 429-436.
- Nam, Y., P. Sliz, et al. (2006). "Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes." *Cell* **124**(5): 973-983.
- Natarajan, S., Y. Li, et al. (2013). "Notch1-induced brain tumor models the sonic hedgehog subgroup of human medulloblastoma." *Cancer Res* **73**(17): 5381-5390.
- Nduom, E. K., C. G. Hadjipanayis, et al. (2012). "Glioblastoma cancer stem-like cells: implications for pathogenesis and treatment." *Cancer J* **18**(1): 100-106.
- Nishimura, T., Y. Fukata, et al. (2003). "CRMP-2 regulates polarized Numb-mediated endocytosis for axon growth." *Nat Cell Biol* **5**(9): 819-826.
- Nishimura, T. and K. Kaibuchi (2007). "Numb controls integrin endocytosis for directional cell migration with aPKC and PAR-3." *Dev Cell* **13**(1): 15-28.
- Nteliopoulos, G. and M. Y. Gordon (2012). "Protein segregation between dividing hematopoietic progenitor cells in the determination of the symmetry/asymmetry of cell division." *Stem Cells Dev* **21**(14): 2565-2580.
- Okano, H., H. Kawahara, et al. (2005). "Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells." *Exp Cell Res* **306**(2): 349-356.
- Okochi, M., H. Steiner, et al. (2002). "Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1." *EMBO J* **21**(20): 5408-5416.
- Oliemuller, E., R. Pelaez, et al. (2013). "Phosphorylated tubulin adaptor protein CRMP-2 as prognostic marker and candidate therapeutic target for NSCLC." *Int J Cancer* **132**(9): 1986-1995.
- Ong Tone, S., B. Dayanandan, et al. (2010). "GSK3 regulates mitotic chromosomal alignment through CRMP4." *PLoS One* **5**(12): e14345.
- Palomero, T., M. Dominguez, et al. (2008). "The role of the PTEN/AKT Pathway in NOTCH1-induced leukemia." *Cell Cycle* **7**(8): 965-970.
- Palomero, T., W. K. Lim, et al. (2006). "NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(48): 18261-18266.
- Parsons, D. W., S. Jones, et al. (2008). "An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme." *Science* **321**(5897): 1807-1812.
- Pasternak, S. H., R. D. Bagshaw, et al. (2003). "Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and gamma-secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane." *J Biol Chem* **278**(29): 26687-26694.
- Patel, S. R., S. S. Bhumbra, et al. (2012). "Epigenetic mechanisms of Groucho/Grg/TLE mediated transcriptional repression." *Mol Cell* **45**(2): 185-195.
- Pece, S., S. Confalonieri, et al. (2011). "NUMB-ing down cancer by more than just a NOTCH." *Biochim Biophys Acta* **1815**(1): 26-43.
- Pece, S., M. Serresi, et al. (2004). "Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis." *J Cell Biol* **167**(2): 215-221.
- Persano, L., E. Rampazzo, et al. (2013). "Glioblastoma cancer stem cells: role of the microenvironment and therapeutic targeting." *Biochem Pharmacol* **85**(5): 612-622.
- Perumalsamy, L. R., M. Nagala, et al. (2010). "Notch-activated signaling cascade interacts with mitochondrial remodeling proteins to regulate cell survival." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(15): 6882-6887.
- Petersen, P. H., K. Zou, et al. (2004). "Continuing role for mouse Numb and Numbl in maintaining progenitor cells during cortical neurogenesis." *Nat Neurosci* **7**(8): 803-811.
- Pintar, A., A. De Biasio, et al. (2007). "The intracellular region of Notch ligands: does the tail make the difference?" *Biol Direct* **2**: 19.

- Polizio, A. H., P. Chinchilla, et al. (2011). "Sonic Hedgehog activates the GTPases Rac1 and RhoA in a Gli-independent manner through coupling of smoothened to Gi proteins." *Sci Signal* **4**(200): pt7.
- Ponnusamy, R. and B. Lohkamp (2013). "Insights into the oligomerization of CRMPs: crystal structure of human collapsin response mediator protein 5." *J Neurochem* **125**(6): 855-868.
- Poteet, E., G. R. Choudhury, et al. (2013). "Reversing the Warburg effect as a treatment for glioblastoma." *J Biol Chem* **288**(13): 9153-9164.
- Poulson, D. F. (1937). "Chromosomal Deficiencies and the Embryonic Development of *Drosophila Melanogaster*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **23**(3): 133-137.
- Purow, B. W., R. M. Haque, et al. (2005). "Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation." *Cancer Res* **65**(6): 2353-2363.
- Qiu, L., C. Joazeiro, et al. (2000). "Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hec-type E3 ubiquitin ligase." *J Biol Chem* **275**(46): 35734-35737.
- Quach, T. T., G. Massicotte, et al. (2008). "CRMP3 is required for hippocampal CA1 dendritic organization and plasticity." *FASEB J* **22**(2): 401-409.
- Quach, T. T., S. M. Wilson, et al. (2013). "Mapping CRMP3 domains involved in dendrite morphogenesis and voltage-gated calcium channel regulation." *J Cell Sci* **126**(Pt 18): 4262-4273.
- Rahajeng, J., S. S. Giridharan, et al. (2010). "Collapsin response mediator protein-2 (Crmp2) regulates trafficking by linking endocytic regulatory proteins to dynein motors." *J Biol Chem* **285**(42): 31918-31922.
- Rampal, R., J. F. Arboleda-Velasquez, et al. (2005). "Highly conserved O-fucose sites have distinct effects on Notch1 function." *J Biol Chem* **280**(37): 32133-32140.
- Rana, N. A., A. Nita-Lazar, et al. (2011). "O-glucose trisaccharide is present at high but variable stoichiometry at multiple sites on mouse Notch1." *J Biol Chem* **286**(36): 31623-31637.
- Rand, M. D., L. M. Grimm, et al. (2000). "Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors." *Mol Cell Biol* **20**(5): 1825-1835.
- Rhyu, M. S., L. Y. Jan, et al. (1994). "Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells." *Cell* **76**(3): 477-491.
- Ricard, D., V. Rogemond, et al. (2001). "Isolation and expression pattern of human Unc-33-like phosphoprotein 6/collapsin response mediator protein 5 (Ulip6/CRMP5): coexistence with Ulip2/CRMP2 in Sema3a- sensitive oligodendrocytes." *J Neurosci* **21**(18): 7203-7214.
- Rogemond, V., C. Auger, et al. (2008). "Processing and nuclear localization of CRMP2 during brain development induce neurite outgrowth inhibition." *J Biol Chem* **283**(21): 14751-14761.
- Sachan, N., A. K. Mishra, et al. (2013). "The *Drosophila* importin- α 3 is required for nuclear import of notch in vivo and it displays synergistic effects with notch receptor on cell proliferation." *PLoS One* **8**(7): e68247.
- Sakamoto, K., S. Yamaguchi, et al. (2002). "The nephroblastoma overexpressed gene (NOV/ccn3) protein associates with Notch1 extracellular domain and inhibits myoblast differentiation via Notch signaling pathway." *J Biol Chem* **277**(33): 29399-29405.
- Salmaggi, A., A. Boiardi, et al. (2006). "Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype." *Glia* **54**(8): 850-860.
- Sanai, N., A. Alvarez-Buylla, et al. (2005). "Neural stem cells and the origin of gliomas." *N Engl J Med* **353**(8): 811-822.
- Sanchez-Irizarry, C., A. C. Carpenter, et al. (2004). "Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats." *Mol Cell Biol* **24**(21): 9265-9273.
- Santolini, E., C. Puri, et al. (2000). "Numb is an endocytic protein." *J Cell Biol* **151**(6): 1345-1352.
- Santoni, M., L. Burattini, et al. (2013). "Essential role of Gli proteins in glioblastoma multiforme." *Curr Protein Pept Sci* **14**(2): 133-140.

- Sarangi, A., J. G. Valadez, et al. (2009). "Targeted inhibition of the Hedgehog pathway in established malignant glioma xenografts enhances survival." *Oncogene* **28**(39): 3468-3476.
- Sato, K., T. Watanabe, et al. (2011). "Numb controls E-cadherin endocytosis through p120 catenin with aPKC." *Mol Biol Cell* **22**(17): 3103-3119.
- Schaaf, C. A., Z. Misulovin, et al. (2013). "The Drosophila Enhancer of Split Gene Complex: Architecture and Coordinate Regulation by Notch, Cohesin and Polycomb Group Proteins." *G3 (Bethesda)*.
- Schmidt, E. F. and S. M. Strittmatter (2007). "The CRMP family of proteins and their role in Sema3A signaling." *Adv Exp Med Biol* **600**: 1-11.
- Schreck, K. C., P. Taylor, et al. (2010). "The Notch target Hes1 directly modulates Gli1 expression and Hedgehog signaling: a potential mechanism of therapeutic resistance." *Clin Cancer Res* **16**(24): 6060-6070.
- Scita, G. and P. P. Di Fiore (2010). "The endocytic matrix." *Nature* **463**(7280): 464-473.
- Sczaniecka, M., K. Gladstone, et al. (2012). "MDM2 protein-mediated ubiquitination of numb protein: identification of a second physiological substrate of MDM2 that employs a dual-site docking mechanism." *J Biol Chem* **287**(17): 14052-14068.
- Seugnet, L., P. Simpson, et al. (1997). "Requirement for dynamin during Notch signaling in Drosophila neurogenesis." *Dev Biol* **192**(2): 585-598.
- Shelly, M., L. Cancedda, et al. (2011). "Semaphorin3A regulates neuronal polarization by suppressing axon formation and promoting dendrite growth." *Neuron* **71**(3): 433-446.
- Shih, A. H. and E. C. Holland (2006). "Notch signaling enhances nestin expression in gliomas." *Neoplasia* **8**(12): 1072-1082.
- Shimada, K., T. Ishikawa, et al. (2013). "Collapsin response mediator protein 2 is involved in regulating breast cancer progression." *Breast Cancer*.
- Shimizu, K., S. Chiba, et al. (1999). "Mouse jagged1 physically interacts with notch2 and other notch receptors. Assessment by quantitative methods." *J Biol Chem* **274**(46): 32961-32969.
- Sigismund, S., T. Woelk, et al. (2005). "Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(8): 2760-2765.
- Singh, S. K., I. D. Clarke, et al. (2004). "Cancer stem cells in nervous system tumors." *Oncogene* **23**(43): 7267-7273.
- Singh, S. K., C. Hawkins, et al. (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." *Nature* **432**(7015): 396-401.
- Sorensen, E. B. and S. D. Conner (2008). "AAK1 regulates Numb function at an early step in clathrin-mediated endocytosis." *Traffic* **9**(10): 1791-1800.
- Sorensen, E. B. and S. D. Conner (2010). "gamma-secretase-dependent cleavage initiates notch signaling from the plasma membrane." *Traffic* **11**(9): 1234-1245.
- Sorkin, A. and M. von Zastrow (2009). "Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(9): 609-622.
- Sottoriva, A., I. Spiteri, et al. (2013). "Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(10): 4009-4014.
- Spana, E. P. and C. Q. Doe (1996). "Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates." *Neuron* **17**(1): 21-26.
- Sprinzak, D., A. Lakhanpal, et al. (2010). "Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states." *Nature* **465**(7294): 86-90.
- Sriuranpong, V., M. W. Borges, et al. (2001). "Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells." *Cancer Res* **61**(7): 3200-3205.
- Stahl, M., K. Uemura, et al. (2008). "Roles of Pofut1 and O-fucose in mammalian Notch signaling." *J Biol Chem* **283**(20): 13638-13651.
- Stenmark, P., D. Ogg, et al. (2007). "The structure of human collapsin response mediator protein 2, a regulator of axonal growth." *J Neurochem* **101**(4): 906-917.

- Stephenson, N. L. and J. M. Avis (2012). "Direct observation of proteolytic cleavage at the S2 site upon forced unfolding of the Notch negative regulatory region." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(41): E2757-2765.
- Susini, L., B. J. Passer, et al. (2001). "Siah-1 binds and regulates the function of Numb." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 15067-15072.
- Tagami, S., M. Okochi, et al. (2008). "Regulation of Notch signaling by dynamic changes in the precision of S3 cleavage of Notch-1." Mol Cell Biol **28**(1): 165-176.
- Tahimic, C. G., N. Tomimatsu, et al. (2006). "Evidence for a role of Collapsin response mediator protein-2 in signaling pathways that regulate the proliferation of non-neuronal cells." Biochem Biophys Res Commun **340**(4): 1244-1250.
- Takeuchi, H., J. Kantharia, et al. (2012). "Site-specific O-glucosylation of the epidermal growth factor-like (EGF) repeats of notch: efficiency of glycosylation is affected by proper folding and amino acid sequence of individual EGF repeats." J Biol Chem **287**(41): 33934-33944.
- Tamura, K., Y. Taniguchi, et al. (1995). "Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H)." Curr Biol **5**(12): 1416-1423.
- Tang, H., S. B. Rompani, et al. (2005). "Numb proteins specify asymmetric cell fates via an endocytosis- and proteasome-independent pathway." Mol Cell Biol **25**(8): 2899-2909.
- Tang, J. Y., H. W. Chang, et al. (2013). "Modulating roles of amiloride in irradiation-induced antiproliferative effects in glioblastoma multiforme cells involving akt phosphorylation and the alternative splicing of apoptotic genes." DNA Cell Biol **32**(9): 504-510.
- Tanigaki, K. and T. Honjo (2010). "Two opposing roles of RBP-J in Notch signaling." Curr Top Dev Biol **92**: 231-252.
- Tchoghandjian, A., N. Baeza, et al. (2010). "A2B5 cells from human glioblastoma have cancer stem cell properties." Brain Pathol **20**(1): 211-221.
- Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." Nat Rev Cancer **2**(6): 442-454.
- Thomas, E., N. Zeps, et al. (2011). "14-3-3sigma (sigma) regulates proliferation and differentiation of multipotent p63-positive cells isolated from human breastmilk." Cell Cycle **10**(2): 278-284.
- Tokumitsu, H., N. Hatano, et al. (2005). "Phosphorylation of Numb family proteins. Possible involvement of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases." J Biol Chem **280**(42): 35108-35118.
- Tokumitsu, H., N. Hatano, et al. (2006). "Phosphorylation of Numb regulates its interaction with the clathrin-associated adaptor AP-2." FEBS Lett **580**(24): 5797-5801.
- Uchida, H., K. Arita, et al. (2011). "Role of sonic hedgehog signaling in migration of cell lines established from CD133-positive malignant glioma cells." J Neurooncol **104**(3): 697-704.
- Uchida, Y., T. Ohshima, et al. (2005). "Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3beta phosphorylation of CRMP2: implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease." Genes Cells **10**(2): 165-179.
- Uemura, T., S. Shepherd, et al. (1989). "numb, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in Drosophila embryos." Cell **58**(2): 349-360.
- Ulasov, I. V., S. Nandi, et al. (2011). "Inhibition of Sonic hedgehog and Notch pathways enhances sensitivity of CD133(+) glioma stem cells to temozolomide therapy." Mol Med **17**(1-2): 103-112.
- Upadhyay, A., V. Kandachar, et al. (2013). "Sanpodo controls sensory organ precursor fate by directing Notch trafficking and binding gamma-secretase." J Cell Biol **201**(3): 439-448.
- Uyttendaele, H., G. Marazzi, et al. (1996). "Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene." Development **122**(7): 2251-2259.
- Varrin-Doyer, M., P. Vincent, et al. (2009). "Phosphorylation of collapsin response mediator protein 2 on Tyr-479 regulates CXCL12-induced T lymphocyte migration." J Biol Chem **284**(19): 13265-13276.

- Verhaak, R. G., K. A. Hoadley, et al. (2010). "Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1." Cancer Cell **17**(1): 98-110.
- Veyrac, A., N. Giannetti, et al. (2005). "Expression of collapsin response mediator proteins 1, 2 and 5 is differentially regulated in newly generated and mature neurons of the adult olfactory system." Eur J Neurosci **21**(10): 2635-2648.
- Veyrac, A., S. Reibel, et al. (2011). "CRMP5 regulates generation and survival of newborn neurons in olfactory and hippocampal neurogenic areas of the adult mouse brain." PLoS One **6**(10): e23721.
- Villalonga-Planells, R., L. Coll-Mulet, et al. (2011). "Activation of p53 by nutlin-3a induces apoptosis and cellular senescence in human glioblastoma multiforme." PLoS One **6**(4): e18588.
- Vincent, P., Y. Collette, et al. (2005). "A role for the neuronal protein collapsin response mediator protein 2 in T lymphocyte polarization and migration." J Immunol **175**(11): 7650-7660.
- Vlashi, E., C. Lagadec, et al. (2011). "Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(38): 16062-16067.
- Wall, D. S., A. J. Mears, et al. (2009). "Progenitor cell proliferation in the retina is dependent on Notch-independent Sonic hedgehog/Hes1 activity." J Cell Biol **184**(1): 101-112.
- Wang, J., T. P. Wakeman, et al. (2010). "Notch promotes radioresistance of glioma stem cells." Stem Cells **28**(1): 17-28.
- Wang, J., C. Wang, et al. (2012). "siRNA targeting Notch-1 decreases glioma stem cell proliferation and tumor growth." Mol Biol Rep **39**(3): 2497-2503.
- Wang, L. H. and S. M. Strittmatter (1996). "A family of rat CRMP genes is differentially expressed in the nervous system." J Neurosci **16**(19): 6197-6207.
- Wang, W. L., T. M. Hong, et al. (2012). "Phosphorylation of LCRMP-1 by GSK3beta promotes filopodia formation, migration and invasion abilities in lung cancer cells." PLoS One **7**(2): e31689.
- Wang, Y., L. Shao, et al. (2001). "Modification of epidermal growth factor-like repeats with O-fucose. Molecular cloning and expression of a novel GDP-fucose protein O-fucosyltransferase." J Biol Chem **276**(43): 40338-40345.
- Westhoff, B., I. N. Colaluca, et al. (2009). "Alterations of the Notch pathway in lung cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(52): 22293-22298.
- Wharton, K. A., K. M. Johansen, et al. (1985). "Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats." Cell **43**(3 Pt 2): 567-581.
- Whiteman, P., B. H. de Madrid, et al. (2013). "Molecular basis for Jagged-1/Serrate ligand recognition by the Notch receptor." J Biol Chem **288**(10): 7305-7312.
- Wirtz-Peitz, F., T. Nishimura, et al. (2008). "Linking cell cycle to asymmetric division: Aurora-A phosphorylates the Par complex to regulate Numb localization." Cell **135**(1): 161-173.
- Woodhoo, A., M. B. Alonso, et al. (2009). "Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity." Nat Neurosci **12**(7): 839-847.
- Wu, G., S. Lyapina, et al. (2001). "SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation." Mol Cell Biol **21**(21): 7403-7415.
- Xie, M., C. S. He, et al. (2013). "Notch-1 contributes to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor acquired resistance in non-small cell lung cancer in vitro and in vivo." Eur J Cancer.
- Xu, P., M. Qiu, et al. (2010). "The oncogenic roles of Notch1 in astrocytic gliomas in vitro and in vivo." J Neurooncol **97**(1): 41-51.
- Xu, P., S. Yu, et al. (2009). "Differential expression of Notch family members in astrocytomas and medulloblastomas." Pathol Oncol Res **15**(4): 703-710.
- Yamashita, N., A. Morita, et al. (2007). "Regulation of spine development by semaphorin3A through cyclin-dependent kinase 5 phosphorylation of collapsin response mediator protein 1." J Neurosci **27**(46): 12546-12554.

- Yamashita, N., B. Mosinger, et al. (2011). "CRMP5 (collapsin response mediator protein 5) regulates dendritic development and synaptic plasticity in the cerebellar Purkinje cells." J Neurosci **31**(5): 1773-1779.
- Yoshimura, T., N. Arimura, et al. (2006). "Signaling networks in neuronal polarization." J Neurosci **26**(42): 10626-10630.
- Yoshimura, T., Y. Kawano, et al. (2005). "GSK-3 β regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity." Cell **120**(1): 137-149.
- Zhang, X., T. Chen, et al. (2012). "Notch1 promotes glioma cell migration and invasion by stimulating beta-catenin and NF-kappaB signaling via AKT activation." Cancer Sci **103**(2): 181-190.
- Zhang, Z., A. K. Ottens, et al. (2007). "Calpain-mediated collapsin response mediator protein-1, -2, and -4 proteolysis after neurotoxic and traumatic brain injury." J Neurotrauma **24**(3): 460-472.
- Zheng, H., H. Ying, et al. (2008). "p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation." Nature **455**(7216): 1129-1133.
- Zheng, L., C. A. Saunders, et al. (2013). "Notch signaling from the endosome requires a conserved dileucine motif." Mol Biol Cell **24**(3): 297-307.
- Zhong, W., J. N. Feder, et al. (1996). "Asymmetric localization of a mammalian numb homolog during mouse cortical neurogenesis." Neuron **17**(1): 43-53.
- Zhu, T. S., M. A. Costello, et al. (2011). "Endothelial cells create a stem cell niche in glioblastoma by providing NOTCH ligands that nurture self-renewal of cancer stem-like cells." Cancer Res **71**(18): 6061-6072.
- Zilian, O., C. Saner, et al. (2001). "Multiple roles of mouse Numb in tuning developmental cell fates." Curr Biol **11**(7): 494-501.
- Zwahlen, C., S. C. Li, et al. (2000). "Multiple modes of peptide recognition by the PTB domain of the cell fate determinant Numb." EMBO J **19**(7): 1505-1515.